

RAZLIČNE OBLIKE CELIČNE SMRTI IN VLOGA REAKTIVNIH KISIKOVIH ZVRSTI PRI SIGNALIZACIJI CELIČNE SMRTI

Nežka Kavčič

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: prof. ddr. Boris Turk, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Veronika Stoka, predsednica, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Marko Fonović, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Mateja Erdani Kreft, članica, Institut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, UL,
Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Nežka Kavčič

RAZLIČNE OBLIKE CELIČNE SMRTI IN VLOGA
REAKTIVNIH KISIKOVIH ZVRSTI PRI SIGNALIZACIJI
CELIČNE SMRTI

Doktorska disertacija

DIFFERENT TYPES OF CELL DEATH AND THE ROLE OF
REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CELL DEATH
SIGNALLING

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. ddr. Boris Turk

Ljubljana, Slovenija, junij, 2018

Zahvala

Doktorski študij v okviru podiplomskega študija Nanoznanosti in nanotehnologije in delo na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, na Institutu "Jožef Stefan", sta gotovo močno vplivala na moje življenje (ter ljudi okrog mene) in ta izkušnja bi gotovo bila manj prijetna brez podpore in smernic, ki sem ju prejela od mnogih.

Najprej bi se rada zahvalila akademiku prof. dr. Vitu Turku, ki je v meni opazil potencial. Prof. ddr. Borisu Turku gre posebna zahvala, ker me je sprejel v svojo raziskovalno skupino in mi omogočil, da je to delo nastalo. Poleg tega pa bi mu rada izrazila iskreno zahvalo za vodstvo v času doktorskega študija in strokovno pomoč pri pisanju člankov.

Zahvala gre tudi vsem trem članom komisije, prof. dr. Veroniki Stoka, prof. dr. Marku Fonoviču in izr. prof. Mateji Erdani Kreft, ki so kritično in natančno pregledali doktorsko nalogo.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Petru Vandenabeelu (VIB; Ghent, Belgija) za ves darovani material in za predloge ter komentarje pri pripravi članka.

Naslednje vrstice so namenjene vsem bivšim in sedanjim sodelavcem:

- Katarini Pegan bi se rada zahvalila za vedno vester osebni pristop, prijazen odziv in za vse strokovne napotke;
- Barbara Sobotič: hvala, ker si si vzela nešteto krat čas za posvet in ker si vedno našla toplo besedo in razumevanje, ko sem ju potrebovala;
- Janja Božič: zahvaljujem se ti za interne šale (tudi na račun enakih nogavic), klepetave pavze med pisanjem, motivacijska sporočila, in nesebično pomoč pri reševanju takih in drugačnih zagat;
- Janja Završnik in Miha Butinar: hvala za pomoč pri delu v hlevčku, za nasvete in pripombe pri skupnem delu in smejalne urice v B320;
- Jelena Rajković, Maruša Hafner Česen, Ajda Taler Verčič, Barbara Jerič Kokelj in Gabriela Droga Mazovec: hvala za radodarnost in izredno pripravljenost za kakršno koli pomoč in pa vedno iskreno prijaznost, ki je ne bom nikoli pozabila;
- Marija Grozdanič, Andreja Bratovš, Aleksander Krajnc, Lovro Kramer, Matej Vizovišek in Robert Vidmar – hvala, ker ste vsak po svoje obogatili čas, ki smo ga preživeli na B1 ali pa izven IJS – kot skupina smo z medsebojnimi nasveti in sodelovanjem zgradili posebno prijateljsko vez;
- triperesna deteljica – Eva Vidak, Urban Javoršek in Monika Biasizzo – hvala, ker mene in vse ostale navdihujete s svežo energijo in idejami;
- Polona Pirš, Mojca Trstenjak Prebanda, Ivica Štefe, Andreja Sekirnik in Dejan Pelko – hvala vsem za koristne napotke, pomoč pri delu v "navadnem" in celičnem laboratoriju, nabavnih zagatah in reševanju problemov z raznoraznimi aparaturami;
- Barbara Vrtačnik in Maja Orehek: zahvaljujem se vama za pozitivno energijo in številne (življenjske) nasvete ter pomoč pri lažjem premagovanju ovir;
- zahvala gre tudi ostalim sodelavcem - delo takega obsega bi bilo težje pripraviti brez pomoči naklonjenega okolja.

Iz vsega srca hvala mojim Bejbam Finim za podporo in ker ste verjele vame. Hvala tudi moji tekaški ekipi za skupno sproščanje stresnih hormonov in nabiranje endorfinov. Hvala tudi vsem ostalim, ki ste na kakršen koli način prispevali, vplivali ali kako drugače zaznamovali mojo življenjsko pot v času podiplomskega študija.

Posebno zahvalo namenjam vsem mojim najbližjim, predvsem Georgyu, ki je navijal zame v ciljnem sprintu; bratu Boru in njegovi Kaji, ki sta s prijazno besedo in pogovorom olajšala marsikateri turoben dan; in dragima staršema, Ivanu in Sonji, ki sta me naučila vztrajnosti (ali pa trme) in sta me potrpežljivo spodbujala od starta do cilja v vseh ozirih in jima bom večno hvaležna.

Povzetek

Celična smrt je neizogibna posledica celičnega življenja. V zadnjih desetletjih so raziskovalci opisali številne gensko zapisane mehanizme za ciljno odstranjevanje odvečnih, nepopravljivo poškodovanih in škodljivih celic. Oksidativni stres, ki vpliva na številne celične gradnike, je prav tako povezan s celično smrtjo. V naši študiji smo pojasnili učinek oksidativnega stresa z uporabo štirih različnih modelov celične smrti: nekroza, sproščena z menadionom, notranja/intrinzična apoptoza, ki jo povzroča staurosporin, ter zunanja/ekstrinzična apoptoza in nekroptoza, ki ju sproži TNF (dejavnik tumorske nekroze). V ta namen smo uporabili tudi štiri različne lovilce ROS (reaktivne kisikove zvrsti), N-acetil-L-cistein (NAC), α -tokoferol (α TOC) in dva mimetika superoksid dismutaze n(III)tetrakis (4-benzojsko kislino) porfirin klorid (MnTBAP) ter 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil (Tempol; TE). Naši rezultati kažejo, da je NAC v celoti preprečil nekrozo, ki jo je sprožil menadion, vendar pa smo ugotovili, da odstranjevanje ROS z drugimi antioksidanti ni imelo vpliva na ostale oblike celične smrti. Poleg tega je Tempol lahko znatno preprečil ekstrinzično apoptozo in delno zmanjšal nekroptozo, ki jo sproži TNF. Ostali antioksidanti niso imeli pomembnega vpliva na potek celične smrti.

Poleg tega smo proučevali permeabilizacijo lizosomske membrane (LMP), ki je odvisna od delovanja katepsinov in lahko sproži različne oblike celične smrti. Sintetični lizosomotropični detergent L-Leucil-leucin metil ester (LLOMe), ki vpliva na aktivnost katepsina C in naluknjane lizosomov, ki vodi v celično smrt, smo izbrali kot sprožilec za to študijo. Opazili smo, da inkubacija celic z LLOMe povzroči zgodnje povišanje lizosomskega pH, ki mu sledi LMP in sproščanje hidrolaz, selektivni zaviralec katepsina C, GlyPheDMK, pa lahko vse te učinke prepreči. Nasprotno pa je splošni zaviralec katepsinov E64d učinkovito preprečil celično smrt, vendar le delno ohranil normalen lizosomski pH. Ta mehanizem smo potrdili z uporabo različnih tipov primarnih celic z izbitim genom za glavni citosolni inhibitor katepsinov, stefin B (PyMT D.T. in PyMT StfB -/-), in celic, ki so imele izbitje genov za katepsina B in L (MEF D.T. in MEF DKO). Glede na rezultate sklepamo, da je katepsin C potreben za iztok lizosomskih katepsinov v citosol, kjer slednji v naslednjem koraku sprožijo od kaspaz odvisno celično smrt.

Doktorska naloga predstavlja nova spoznanja tako na področju celične smrti in vlogi ROS v celični smrti kot na področju delovanja lizosomotropičnega detergenta LLOMe v celici. Natančnejše poznavanje teh mehanizmov je ključno pri regulaciji celične smrti, kar ima lahko med drugim pomemben vpliv na načrtovanje zdravljenja.

Abstract

Cell death is an inevitable consequence of cellular life. In the past decades, researchers characterized a set of genetically encoded mechanisms for targeted elimination of superfluous, irreversibly damaged and harmful cells. Oxidative stress is also related to cell death by affecting a wide variety of cellular components. In our study, we studied the impact of oxidative stress produced by four different cell death models: menadione-triggered necrosis, staurosporine-induced intrinsic apoptosis, and TNF (tumour necrosis factor)-stimulated extrinsic apoptosis and necroptosis. For that purpose, four different ROS (reactive oxygen species) scavengers, N-acetyl-L-cysteine (NAC), α -tocopherol (α TOC) and two superoxide dismutase mimetics, n(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP), and 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (Tempol; TE) were used. Our results show that the menadione-triggered necrosis was completely prevented by NAC, however, the ROS targeting was found to have a marginal effect on the other cell death modalities. Moreover, Tempol was able to substantially prevent TNF-induced extrinsic apoptosis and partially decreased TNF-induced necroptosis. Other antioxidants did not demonstrate any significant cell death prevention.

Furthermore, we investigated the lysosomal membrane permeabilization (LMP) which is mediated by cathepsins that can trigger a variety of cell death modalities. The synthetic lysosomotropic detergent L-Leucyl-leucine methyl ester (LLOMe), which causes cathepsin C activity and lysosomal leaking, leading to cell death, was chosen as a model molecule for this study. We observed that while the incubation of cell with LLOMe leads to an early increase in lysosomal pH, followed by LMP and release of hydrolases, the selective inhibitor of cathepsin C, GlyPheDMK, can prevent all these processes. In contrast, the broad spectrum cathepsin inhibitor E64d efficiently prevented cell death, but only partially lysosomal pH increase. This mechanism was confirmed using different types of primary cells deficient for the major cytosolic inhibitor of cathepsins, stefin B (PyMT W.T. and PyMT StfB $-/-$), and cells double deficient for cathepsins B and L (MEF W.T. and MEF DKO). According to the results we propose that cathepsin C is required for the exit of lysosomal cathepsins into the cytosol, where the latter then trigger caspase-dependent cell death in the next step.

Doctoral dissertation presents new findings in both in the field of cell death and the role of ROS in cell death and in the field of the mechanism of action of lysosomotropic detergent LLOMe in cells. Understanding of these mechanisms is crucial in cell death regulation, since it might affect for designing treatments.

Kazalo

Zahvala	v
Povzetek	vii
Abstract	ix
Kazalo	xi
Slike	xv
Tabele	xxi
Kratice	xxiii
1 Uvod	1
1.1 Celična smrt	1
1.1.1 Apoptoza.....	1
1.1.1.1 Kaspaze.....	1
1.1.1.2 Intrinzična (mitohondrijska) pot apoptoze.....	3
1.1.1.3 Ekstrinzična (receptorska) pot apoptoze.....	4
1.1.2 Signalizacija preko receptorja TNF	6
1.1.2.1 Preživetvena pot	6
1.1.2.2 S TNF sprožena apoptoza.....	8
1.1.2.3 Nekroptoza.....	9
1.1.3 Nekroza.....	11
1.2 Avtofagija.....	11
1.2.1 Makroavtofagija.....	12
1.2.2 Avtofagična celična smrt	14
1.3 Oksidativni stres.....	14
1.3.1 Antioksidanti	15
1.4 Lizosomi in lizosomska celična smrt	17
1.4.1 Lizosomi.....	17
1.4.1.1 Katepsini.....	18
1.4.2 Lizosomotropiki.....	19
1.4.3 Lizosomska celična smrt.....	20
2 Namen dela in hipoteze	23
3 Materiali in metode	25
3.1 Materiali.....	25
3.1.1 Kemikalije	25
3.1.1.1 Inhibitorji in antioksidanti	25
3.1.1.2 Sprožilci celične smrti in lizosomotropiki	25
3.1.1.3 Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati	25
3.1.1.4 Ostale kemikalije	25
3.1.2 Celične linije in celične kulture	26
3.1.3 Gojišča, dodatki za gojišča in delo s celicami	26
3.1.4 Protitelesa	26
3.1.4.1 Primarna protitelesa.....	26
3.1.4.2 Sekundarna protitelesa.....	27
3.1.5 Pufri in raztopine	27

3.1.6	Laboratorijska oprema	28
3.2	Metode.....	29
3.2.1	Osnovne metode dela s celicami.....	29
3.2.1.1	Priprava gojišč in gojenje celičnih linij.....	29
3.2.1.2	Priprava primarnih celic mišjih embrionalnih fibroblastov	30
3.2.1.3	Priprava primarnih celic mišjih tumorskih celic adenokarcinoma mlečne žleze (PyMT wt in PyMT stfB -/-)	30
3.2.1.4	Odmrzovanje celic	30
3.2.1.5	Precepljanje adherentnih celic	30
3.2.1.6	Precepljanje suspenzijskih celic.....	30
3.2.1.7	Zamrzovanje celic	30
3.2.2	Tretiranje celic	30
3.2.3	Meritve na pretočnem citometru.....	31
3.2.3.1	Določanje deleža mrtvih celic.....	31
3.2.3.2	Spremljanje nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti	31
3.2.3.3	Določanje deleža celic s poškodovanimi lizosomi	32
3.2.4	Priprava celičnih lizatov in analiza proteinov	32
3.2.4.1	Priprava popolnega celičnega lizata.....	32
3.2.4.2	Priprava citosolnega celičnega lizata	32
3.2.4.3	Določanje koncentracije proteinov v vzorcu	32
3.2.4.4	Merjenje aktivnosti kaspaze 3	33
3.2.4.5	Merjenje aktivnosti cisteinskih katepsinov	33
3.2.4.6	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE)	33
3.2.4.7	Prenos western in imunodetekcija proteinov	33
3.2.5	statistična analiza	34
4	Rezultati	35
4.1	Proučevanje vpliva antioksidantov na oksidativni stres in celično smrt	35
4.1.1	Sprožitev celične smrti z različnimi sprožilci celične smrti.....	35
4.1.2	Sprožilci celične smrti vplivajo na avtofagijo.....	39
4.1.3	Sprožilci celične smrti povzročijo nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti.....	40
4.1.4	Vpliv antioksidantov na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti	42
4.1.5	Vpliv antioksidantov na celično smrt	46
4.1.6	Vpliv antioksidantov na TNF sproženo preživetveno pot.....	48
4.1.7	Ne-antioksidativno delovanje Tempola	49
4.2	Analiza mehanizma delovanja lizosomotropičnega detergenta LLOMe.....	52
4.2.1	Določitev prisotnosti katepsinov in stefina B v različnih celičnih linijah	52
4.2.2	Sprožitev celične smrti z LLOMe.....	52
4.2.3	LLOMe vpliva na lizosome	55
4.2.4	LLOMe deluje kot lizosomotropični detergent.....	57
4.2.5	Vpliv LLOMe na celice PyMT divjega tipa in celice z izbitim genom za stefin B.....	60
4.2.6	Vpliv LLOMe na celice MEF divjega tipa in celice z izbitima genomoma za katepsin B in L	62
4.2.7	LLOMe vpliva na povišanje oksidativnega stresa v celicah	64
4.2.8	LLOMe vpliva na avtofagijo	65
5	Razprava	67
5.1	Vpliv antioksidantov na oksidativni stres in celično smrt.....	67
5.2	Mehanizem delovanja lizosomotropičnega detergenta LLOMe.....	69
6	Zaključki	75
	Literatura	77
	Bibliografija	91
	Objave v povezavi z delom	91
	Prispevek na konferenci	91
	Druge objave – prispevki dijakov in študentov	92
	Biografija	93

Priloge

95

Slike

- Slika 1: Organizacija domen in mehanizem aktivacije kaspaz. Sprožitvene kaspaze so prisotne v celici kot neaktivni zimogeni in se aktivirajo z dimerizacijo. Sestavljene so iz prodomene (DED ali CARD), velike in majhne podenote. Izvršitvene kaspaze pa se aktivirajo s cepitvijo med podenotama. Slika je prirejena po (Green in Llambi, 2015). 2
- Slika 2: Shema poteka intrinzične (mitohondrijske) poti apoptoze. Slika je prirejena po (Marino in sod., 2014). 4
- Slika 3: Signaliziranje preko receptorjev Fas in TRAILR. Slika je prirejena po (Green in Llambi, 2015). 5
- Slika 4: Kanonična pot aktivacije NF- κ B. Povzeto po (Hayden in Ghosh, 2014). 8
- Slika 5: Sprožitev apoptoze preko receptorja TNFR1. Po vezavi TNF nastane kompleks I. V kolikor je preživetvena pot inhibirana, lahko nastane kompleks IIa ali pa kompleks IIb, ki sta ključna za aktivacijo kaspaze 8. Povzeto po (Vanden Berghe in sod., 2014). 9
- Slika 6: Signalizacija pri nekroptozu. Ključen je nastanek kompleksa IIc, kjer pride do aktivacije RIP1 in RIP3 ter posledično do fosforilacije MLKL. Povzeto po (Vanden Berghe in sod., 2014). 11
- Slika 7: Shema signalne poti pri makroavtofagiji. Slika prirejena po (Kaur in Debnath, 2015). 14
- Slika 8: Poenostavljen prikaz nastajanja ROS v mitochondrijih in kje naj bi NAC, MnTBAP, TE in α TOC kot antioksidanti delovali. 15
- Slika 9: Raven LMP vpliva na celično smrt. Ko je raven LMP nizka ali zmerna, lahko celica sproži reševalni mehanizem preko lizofagije oz. poteče apoptoza ali pa ena izmed oblik regulirane nekroze. Ko je raven LMP previsoka, celica umre z nekrozo. Povzeto po (Kavcic in sod., 2016). 20
- Slika 10: Shematski prikaz vključenosti lizosomov v programirano celično smrt in njeno regulacijo. LCS – lizosomska celična smrt. Povzeto po (Kavcic in sod., 2016). 21
- Slika 11: Različni tipi celične smrti v celičnih kulturah MEF in L929. Odstotek mrtvih celih po tretiranju MEF in L929 z A) 75 μ M MD, B) 1 μ M STS, C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) oziroma samo TNF (10 ng/ml) v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice so definirane kot aneksin V-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 36
- Slika 12: Celična smrt, analizirana s pretočno citometrijo. Po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti ter barvanju z aneksin V-PE in PI smo celice analizirali s pretočno citometrijo. Rezultate v določeni časovni točki smo prikazali kot točkovne diagrame oz. histograme za A) ter B) MEF in C) ter D) L929 (oznake kvadrantov: ZL – zgoraj levo, ZD – zgoraj desno, SL – spodaj levo, SD – spodaj desno). Net – netretiran. 37
- Slika 13: Aktivnost kaspaz v celicah MEF in L929 po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti. A) Celice MEF smo tretirali s 75 μ M MD, 1 μ M STS in TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX). B) Celice L929 pa smo tretirali s 75 μ M MD in 1 μ M STS. Po ustrezno dolgi inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate. Kaspazno aktivnost smo merili fluorimetrično 30 minut na podlagi hidrolize substrata Ac-DEVD-AFC. Rezultati so bili podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice),

- nato pa normalizirani na kontrolo (v času 0 h). Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD..... 38
- Slika 14: Sprememba LC3 na proteinski ravni celic MEF po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti. Celice MEF smo tretirali z različnimi sprožilci celične smrti. Po pretečeni inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru. Proteine smo ločili z NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi za protein LC3 in aktin. A) Sprememba LC3 po času po tretiranju s 75 μ M MD in 1 μ M STS. B) Sprememba LC3 po času po tretiranju s TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). 39
- Slika 15: Sprememba LC3 na proteinski ravni celic L929 po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti. Celice L929 smo tretirali z različnimi sprožilci celične smrti. Po pretečeni inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru. Proteine smo ločili z NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi za protein LC3 in aktin. Sprememba LC3 v odvisnosti od časa po tretiranju s A) 75 μ M MD; B) 1 μ M STS in C) TNF (10 ng/ml)..... 40
- Slika 16: Sprožilci celične smrti spodbudijo nastajanje znotrajceličnih ROS, preden začne naraščati odstotek mrtvih celic. Celice MEF in L929 smo tretirali z A) 75 μ M MD, B) 1 μ M STS, C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) oziroma samo TNF (10 ng/ml) v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po tretiranju smo celicam dodali še CM-H₂DCFDA in vzorce pripravili za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 41
- Slika 17: Sprožilci celične smrti lahko spodbudijo nastajanje mitohondrijskih ROS. Celice MEF in L929 smo tretirali z A) 75 μ M MD, B) 1 μ M STS, C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) oziroma samo TNF (10 ng/ml) v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po tretiranju smo celicam dodali še MitoSOX in vzorce pripravili za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 42
- Slika 18: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah MEF. Celice MEF smo tretirali 30 min s 75 μ M MD, 1 μ M STS ali pa 14 h s TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). Antioksidante A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 43
- Slika 19: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah MEF v odvisnosti od časa. Antioksidante 1 mM NAC, 5 mM α TOC, 25 μ M MnTBAP in 0,1 oz. 3 mM Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Celice smo nato tretirali različno dolgo z A, B) MD (75 μ M), C, D) STS (1 μ M), E, F) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in G, H) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 44
- Slika 20: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah L929. Celice L929 smo tretirali 30 min s 75 μ M MD, 1 μ M STS ali pa 18 h s TNF (10 ng/ml TNF). Antioksidante A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino

- intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 45
- Slika 21: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah L929 v odvisnosti od časa. Antioksidante 1 mM NAC, 5 mM α TOC, 25 μ M MnTBAP in 0,1 oz. 3 mM Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Celice smo nato tretirali različno dolgo z A, B) MD (75 μ M), C, D) STS (1 μ M), E, F) in TNF (10 ng/ml TNF). Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 46
- Slika 22: Vpliv antioksidantov na celično smrt v celicah MEF. Izbrane koncentracije antioksidantov A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Celice MEF smo tretirali 4 h s 75 μ M MD, 24 h z 1 μ M STS ali pa 14 h s TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice so definirane kot aneksinV-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 47
- Slika 23: Vpliv antioksidantov na celično smrt v celicah L929. Izbrane koncentracije antioksidantov A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Celice L929 smo tretirali 4 h s 75 μ M MD, 24 h z 1 μ M STS ali pa 18 h z 10 ng/ml TNF. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice so definirane kot aneksinV-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 48
- Slika 24: Prisotnost I κ B α v celicah MEF po tretiranju z antioksidanti in TNF. Celice MEF smo najprej tretirali z antioksidanti (100 μ M Tempol, 3 mM Tempol, 5 mM Tempol, 1 mM NAC in 25 μ M MnTBAP) in 2 h zatem dodali še TNF (100 ng/ml). Po ustrezno dolgi inkubaciji smo pripravili popolne lizate, nato pa smo naredili NaDS PAGE, prenos po westernu in imunodetekcijo I κ B α in aktina. 49
- Slika 25: Prisotnost I κ B α v celicah L929 po tretiranju z antioksidanti in TNF. Celice L929 smo najprej tretirali z antioksidanti (100 μ M Tempol, 3 mM Tempol, 5 mM Tempol, 1 mM NAC in 25 μ M MnTBAP) in 2 h zatem dodali še TNF (10 ng/ml). Po ustrezno dolgi inkubaciji smo pripravili popolne lizate, nato pa smo naredili NaDS PAGE, prenos po westernu in imunodetekcijo I κ B α in aktina. 49
- Slika 26: Visoke koncentracije Tempola imajo oksidativni učinek. Celice A) MEF in B) L929 smo 2 h predtretirali s Tempolom, nato pa smo dodali še sprožilce celične smrti: 75 μ M MD za 30 minut, 1 μ M STS za 30 minut, TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) za 14 h oziroma samo TNF (10 ng/ml) za 18 h v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po inkubaciji smo celicam dodali CM-H₂DCFDA ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati so predstavljeni v arbitrarnih enotah. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 50
- Slika 27: Vpliv MnTBAP in Tempola na nastanek mitohondrijskih ROS. Celice A) MEF in B) L929 smo tretirali 30 min 75 μ M MD. Antioksidanta MnTBAP in Tempol smo dodali 2 h pred dodatkom MD. Po končani inkubaciji smo celicam dodali MitoSOX in vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran. 50
- Slika 28: NAC inhibira vpliv Tempola na nastajanje znotrajceličnih ROS in celično smrt. A) Vpliv NAC na znižanje nastajanja znotrajceličnih ROS, ki ga sprožita Tempol (TE) in 75 μ M MD (30 min inkubacija) v celicah MEF. B) Vpliv NAC na celično smrt, ki jo sprožita Tempol (TE) in 75 μ M MD (4 h inkubacija) v celicah MEF. Enak učinek na C) nastajanje

- ROS in D) celično smrt smo opazili pri celicah L929. Antioksidante smo dodali 2 h pred MD. Za spremljanje nastajanja znotrajceličnih ROS smo po končanih inkubacijah celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice pa so definirane kot aneksinV-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 51
- Slika 29: Prenos po westernu in imunodetekcija različnih katapsinov v popolnih celičnih lizatih celic THP-1, U-937, U-87-MG in HeLa. Celice smo gojili na ploščah s premerom 10 cm in nato pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru. Proteine smo ločili na NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi za katapsine B, C, D, L in S ter GAPDH, aktin in stefin B. 52
- Slika 30: Celična smrt po inkubaciji z LLOMe. Celice U-937, THP-1 in U-87-MG smo inkubirali z različnimi koncentracijami LLOMe. A) Po ustrezno dolgi inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slika prikazuje reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Celice U-937 (0,5 mM LLOMe), THP-1 (0,25 mM LLOMe) in U-87-MG (1 mM LLOMe) smo inkubirali različno dolgo. Po končani inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate. Kaspazno aktivnost smo merili fluorimetrično s hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC (10 μ M). Rezultati so bili podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice), nato pa normalizirani na kontrolo (v času 0 h). Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. C) Celice smo 2 h predtretirali z 10 μ M GlyPheDMK, nato pa smo dodali 0,5 mM LLOMe celicam U-937 za 4 h, 0,25 mM LLOMe celicam THP-1 za 4 h in 1 mM LLOMe celicam U-87-MG za 18 h. Vzorce smo pripravili kot na sliki 30A). 54
- Slika 31: Vpliv E64d in zVAD na celično smrt, sproženo z LLOMe. Celice smo inkubirali z E64d (20 μ M) ali pa zVAD (10 μ M) 2 h. Nato smo dodali ustrezne količine LLOMe za 4 h celicam U-937 in THP-1 ter za 18 h celicam U-87-MG. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 55
- Slika 32: LLOMe vpliva na lizosome. A) Po 30-minutnem tretiranju celic U-937, THP-1 in U-87-MG z različnimi koncentracijami LLOMe smo celicam dodali barvilo akridin oranž (AO). Vzorce smo nato pripravili na analizo s pretočnim citometrom. Rezultati predstavljajo geometrijsko sredino intenzitete fluorescence, ki smo jo preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Celice smo najprej 2 h inkubirali z GlyPheDMK (10 μ M), nato pa še 30 minut z LLOMe. Po končani inkubaciji smo vzorce pripravili kot na sliki 32A). Baf – bafilomicin (uporabljen kot pozitivna kontrola). 56
- Slika 33: Vpliv E64d in zVAD na kopičenje barvila akridin oranž po tretiranju z LLOMe. Celice smo inkubirali z E64d (20 μ M) ali pa zVAD (10 μ M) 2 h. Nato smo dodali ustrezne količine LLOMe za 30 minut celicam U-937, THP-1 in U-87-MG. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z akridin oranžem ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati predstavljajo geometrijsko sredino intenzitete fluorescence, ki smo jo preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 57
- Slika 34: Optimizacija koncentracij digitonina za pripravo citosolnih lizatov na celicah. A) Celicam smo dodali različne koncentracije digitonina, da bi sprožili le lizo plazemske membrane (30, 50 in 75 μ g/ml za citosolni lizat) ali pa lizo vseh celičnih membran (200, 300 in 400 μ g/ml za popolni lizat). Po inkubaciji na ledu in centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katapsinov v supernatantu lizata izmerili fluorimetrično. Hidrolizo substrata Z-FR-AMC smo merili 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v

- časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). Na grafih so predstavljeni podatki v arbitrarnih enotah. Slika 34A prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Enak volumen vzorcev smo nanesti na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za aktin in stefin B, ki smo ju nadalje uporabljali za kontrolo. 58
- Slika 35: Citosolna in celokupna aktivnost cisteinskih katepsinov celic U-937, THP-1 in U-87-MG po tretiranju z LLOMe. A) Celice smo tretirali z GlyPheDMK 2 h in zatem smo dodali ustrezno koncentracijo LLOMe za 15 min (0,5 mM za U-937, 0,25 mM za THP-1 in 1 mM za U-87-MG). Po inkubaciji smo celice centrifugirali in pripravili citosolne (75 µg/ml digitonin) ter totalne (400 µg/ml digitonin) lizate. Po centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katepsinov izmerili na podlagi hidrolize substrata zFR-AMC, merili pa smo 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). Na grafih so predstavljeni podatki v arbitrarnih enotah. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Enak volumen vzorcev smo nanesti na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za katepsin C, S, B in L ter aktin in stefin B, ki smo ju uporabljali za kontrolo. Net – netretiran, Cit – citosolni lizat/citosolna aktivnost, Tot – totalni lizat/celokupna aktivnost. 59
- Slika 36: Celokupna aktivnost cisteinskih katepsinov celic U-937, THP-1 in U-87-MG po tretiranju z LLOMe v kombinaciji z GlyPheDMK. A) Celice smo tretirali z GlyPheDMK od 0 h do 2 h in zatem dodali ustrezno koncentracijo LLOMe za 15 min (0,5 mM za U-937, 0,25 mM za THP-1 in 1 mM za U-87-MG). Po inkubaciji smo celice centrifugirali in pripravili totalne lizate (400 µg/ml digitonin). Po centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katepsinov izmerili na podlagi hidrolize substrata zFR-AMC, merili pa smo 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). Na grafih so predstavljeni podatki v arbitrarnih enotah. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Enak volumen vzorcev smo nanesti na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za katepsin C, S, B in L ter aktin in stefin B, ki smo ju uporabljali za kontrolo. Net – netretiran. 60
- Slika 37: Vpliv LLOMe na celice PyMT divjega tipa (D.T.) in celice z izbitim genom za stefin B (StfB -/-). A) Imunodetekcija stefina B in aktina v celicah PyMT. Celice smo gojili na ploščah s premerom 10 cm in nato pripravili popolne celične lizate v pufru RIPA. Proteine smo ločili na NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi. B) Celice PyMT smo 2 h predtretirali z 10 µM GlyPheDMK, nato pa smo dodali 3 mM LLOMe za 18 h. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. C) Celice PyMT smo 2 h predtretirali z 10 µM GlyPheDMK, nato pa smo dodali 3 mM LLOMe za 0,5 h. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z akridin oranžem ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. D) Celice smo tretirali z GlyPheDMK 2 h in zatem dodali 3 mM LLOMe za 15 min. Po inkubaciji smo celice centrifugirali in pripravili citosolne (75 µg/ml digitonin) ter totalne (400 µg/ml digitonin) lizate. Po centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katepsinov izmerili na podlagi hidrolize substrata zFR-AMC, merili pa smo 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). E) Enak volumen vzorcev smo nanesti na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za katepsin C, B in L ter aktin in stefin B. Slike B, C in D prikazujejo en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran, Cit – citosolni lizat/citosolna aktivnost, Tot – totalni lizat/celokupna aktivnost. 62

- Slika 38: Vpliv LLOMe na celice MEF divjega tipa (D.T.) in celice z izbitima genoma za katepsin B in L (DKO). A) Imunodetekcija katepsina B, katepsin L, stefina B in aktina v celicah MEF. Celice smo gojili na ploščah s premerom 10 cm in nato pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru. Proteine smo ločili na NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi. B) Celice MEF smo 5 h tretirali z različnimi koncentracijami LLOMe. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. C) Celicam MEF smo dodali 1 mM LLOMe. Po končani inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate. Kaspazno aktivnost smo merili fluorimetrično s hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC (10 μ M). Rezultati so bili podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice), nato pa normalizirani na kontrolo (v času 0 h). D) Celicam MEF smo dodali različne koncentracije LLOMe in 100 nM bafilomicin (Baf) smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Po polurni inkubaciji smo celice pobarvali z akridin oranžem ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slike B, C in D prikazujejo en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. 63
- Slika 39: LLOMe vpliva na nastajanje znotrajceličnih ROS. A) Najprej smo spremljali nastajanje znotrajceličnih ROS v odvisnosti od časa. Celice U-937 smo tretirali z 0,5 mM LLOMe, THP-1 z 0,25 mM in U-87-MG z 1 mM LLOMe od 0 do 4 h. Po končani inkubaciji smo celicam dodali barvilo CM-H₂DCFDA in vzorce pripravili za analizo s pretočnim citometrom. Stolpci predstavljajo geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunano na arbitrarne enote. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Celice smo tretirali z LLOMe. Antioksidant (1 mM NAC) smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem z LLOMe. Po 1-urni inkubaciji smo vzorce pripravili, kot je navedeno na sliki 39A). 64
- Slika 40: Sprememba LC3 na proteinski ravni celic U-937, THP-1 in U-87-MG po tretiranju z LLOMe. Celice smo tretirali z 0,5 mM LLOMe (U-937), 0,25 mM LLOMe (THP-1) in 1 mM LLOMe (U-87-MG). Po ustrezno dolgih inkubacijah smo pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru in proteine ločili z NaDS PAGE. Nato smo opravili prenos na nitrocelulozno membrano ter označili proteine s specifičnimi protitelesi. 65
- Slika 41: Grafični povzetek o vlogi ROS v celični signalizaciji. Vsi uporabljeni sprožilci celične smrti (menadion – MD, staurosporin – STS in tumor nekrotizirajoči dejavnik – TNF) lahko spodbudijo nastajanje ROS in temu sledi celična smrt. Izbrani antioksidanti so bolj ali manj učinkovito omejili vzbujeni oksidativni stres, vendar so celično smrt kljub vsemu le redko preprečili. Delovanje nekaterih antioksidantov je vprašljivo, zato jih je potrebno ponovno proučiti. 69
- Slika 42: Shema mehanizma delovanja LLOMe. Ko so celice izpostavljene lizosomotropičnemu detergentu LLOMe, se le-ta prične akumulirati v lizosomih, poviša se pH. Katepsin C pripomore k polimerizaciji LLOMe. Polimeri LLOMe imajo membranolitične lastnosti in posledično pride do permeabilizacije lizosomske membrane. Katepsini se izlijejo v citosol in v nekaj urah povzročijo celično smrt. 73

Tabele

Tabela 1: Delitev proteinov družine Bcl-2. Povzeto po (Delbridge in sod., 2016).....	3
Tabela 2: Sprožilci LMP.	19
Tabela 3: Sestava poliakrilamidnih gelov.	28
Tabela 4: Končne koncentracije inhibitorjev, antioksidantov in sprožilcev smrti v gojišču.....	31
Tabela 5: Končne koncentracije inhibitorjev in lizosomotropikov.	31
Tabela 6: Volumni BSA in vode, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje.	33
Tabela 7: Prisotnost katepsinov in stefina B v celičnih linijah THP-1, U-937, U-87-MG in HeLa. Podatki prikazujejo vrednosti RNA sekveniranja celičnih linij, ki so bile objavljene v Human Protein Atlas 13. 9. 2016.	52

Kratice

α TOC	...	alfa tokoferol (angl. alpha tocopherol)
Ac-DEVD-AFC	...	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometilkumarin
AIF	...	dejavnik sprožanja apoptoze (angl. apoptosis-inducing factor)
AMPK	...	AMP-aktivirana proteinska kinaza (angl. AMP-activated protein kinase)
Apaf-1	...	dejavnik 1 aktivacije apoptotne proteaze (angl. apoptotic protease-activating factor 1)
APS	...	amonijev persulfat
ATG	...	Proteini, povezani z avtofagijo (angl. autophagy-related proteins)
ATP/ADP/AMP	...	adenozin trifostaf/adenozin difosfat/adenozin monofosfat
Bak	...	antagonist Bcl-2 in ubijalec (angl. Bcl-2 antagonist/killer)
Bax	...	z Bcl-2 povezan protein x (angl. Bcl-2 associated x protein)
Bcl-2	...	protein 2 iz limfomskih celic B (angl. B-cell lymphoma 2)
Bid	...	protein smrti, ki reagira z domeno BH (angl. BH-3 interacting domain death protein)
BSA	...	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
CARD	...	domena, ki rekrutira kaspaze (angl. caspase recruitment domain)
CHAPS	...	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat
CHX	...	cikloheksimid
cIAP1/2	...	celični inhibitor apoptoze 1 in 2 (angl. cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2)
cit	...	citosolni lizat
cit c	...	citokrom c
CMA	...	avtofagija, posredovana s šaperoni (angl. chaperone-mediated autophagy)
COX	...	ciklooksigenaza (angl. cyclooxygenase)
CYLD	...	cilindromatoza (angl. cylindromatosis)
CYPD	...	ciklofilin D (angl. cyclophilin D)
DAMP	...	poškodbam pridruženi molekularski vzorci (angl. damage-associated molecular patterns)
DD	...	domena smrti (angl. death domain)
DED	...	efektorska domena smrti (angl. death effector domain)
DIABLO	...	protein z nizkim pI, ki neposredno veže IAP (angl. direct IAP binding protein with low pI)
DISC	...	signalni kompleks, ki sproži smrt (angl. death inducing signalling complex)
DMEM	...	Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	...	dimetilsulfoksid
DNA	...	deoksiribonukelinska kislina
DTT	...	ditiotreitol
EDTA	...	etildiamintetraocetna kislina
ESCRT	...	endosomalni ločevalni kompleksi, vključeni v transport (angl. endosomal sorting complexes required for transport)
ETC	...	elektronska transportna veriga (angl. electron transport chain)
FADD	...	protein z domeno smrti, vezan na Fas (angl. Fas-associated death domain protein)
FasL	...	ligand smrti Fas (angl. Fas ligand)
FBS	...	fetusni serum goveda
FLICE	...	ICE, podoben FADD (angl. FADD-like ICE)
FLIP	...	proteini, ki inhibirajo FLICE (angl. FLICE-inhibitory proteins)

HEPES	...	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
Hsp	...	stresni protein (angl. heat shock protein)
HtrA2/Omi	...	protein A2, ki potrebuje visoko temperaturo (angl. high temperature requirement protein A2)
IAP	...	inhibitor apoptoze (angl. inhibitor of apoptosis)
IgG	...	imunoglobulin G
IgM	...	imunoglobulin M
IKK	...	inhibitor jedrnega dejavnika $\kappa\beta$ (angl. inhibitor of nuclear factor $\kappa\beta$)
JNK	...	c-Jun N-terminalna kinaza (angl. c-Jun N-terminal kinase)
Keap1	...	ECH vezan protein 1, podoben Kelch (angl. Kelch-like ECH-associated protein 1)
LAMP	...	lizosomski membranski protein (angl. lysosomal-associated membrane protein)
LC3	...	protein z lahko verigo 3, povezan z mikrotubuli (angl. microtubule-associated protein light chain 3)
LLOMe	...	L-levcil-L-levcin metil ester
LMP	...	permeabilizacija lizosomske membrane (angl. lysosomal-membrane permeabilisation)
LOX	...	lipidna oksigenaza (angl. lipid oxygenase)
LPS	...	lipopolisaharid
LUBAC	...	kompleks, ki veže linearne ubikvitinske verige (angl. linear ubiquitin chain assembly complex)
MAP	...	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (angl. mitogen-activated protein kinase)
MD	...	menadion
MHC	...	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex)
MLKL	...	protein z mešano kinazno aktivnostjo (angl. mixed lineage kinase domain-like protein)
MMP	...	mitohondrijski membranski potencial (angl. mitochondrial membrane potential)
MnTBAP	...	manganov (III) tetrakis(4-benzojska kislina) porfirin (angl. Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin)
MOMP	...	permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane (angl. mitochondrial outer membrane permeabilisation)
MPT	...	začasno povečana propustnost membrane (angl. membrane permeability transition)
mTOR	...	sesalska tarča rapamicina (angl. mammalian target of rapamycin)
NAC	...	N-acetilcistein
NaDS	...	natrijev dodecilsulfat
Nec	...	nekrostatin
NEMO	...	modulator NF- $\kappa\beta$ (angl. NF- $\kappa\beta$ essential modulator)
NF- $\kappa\beta$	...	jedrni dejavnik $\kappa\beta$ (angl. nuclear factor $\kappa\beta$)
NIK	...	NF- $\kappa\beta$ inducibilna kinaza (angl. NF- $\kappa\beta$ inducible kinase)
NOX	...	NAPDH oksidaza (angl. NAPDH oxidase)
NP-40	...	nonident P40 oz. oktilfenoksipolietoksiletanol
Nrf2	...	jedrni dejavnik, povezan z eritroidnim 2 dejavnikom (angl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
p62/SQSTM1	...	sekvestome 1 (angl. sequestosome-1)
PAGE	...	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PAMP	...	Molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (angl. pathogen associated molecular pattern)
PARP	...	poliADP-riboza polimeraza (angl. polyADP-ribose polymerase)
PAS	...	mesto nastanka fagofora (angl. phagophore assembly site)
PBS	...	fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate-buffered saline)
PE	...	fosfatidil etanolamin (angl. phosphatidil ethanolamin)
PEG	...	polietilenglikol (angl. polyetilenglycol)
PGAM	...	protein iz družine fosfogliceratnih mutaz (angl. phosphoglycerate mutase family member)
pH	...	negativni desetiški logaritem aktivnosti H^+ ionov
PI	...	propidijev jodid
PI3K	...	fosfatidilinozitol-3-kinaza

PI3P	...	fosfo-inozitol-3 fosfat (angl. phospho-inositol-3 phosphate)
PIDD	...	protein z domeno smrti, ki ga sproži p53 (angl. p53-induced protein with a death domain)
pufer RIPA	...	pufer za test radioimunoprecipitacije (angl. radioimmunoprecipitation assay buffer)
RHIM	...	RIP homologni interakcijski motiv (RIP homologous interaction motif)
RIP1/3	...	protein 1/3, ki reagira z receptorjem (angl. receptor interacting protein 1/3)
RNA	...	ribonukleinska kislina
RNS	...	reaktivne dušikove zvrsti (angl. reactive nitrogen species)
ROS	...	reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)
SD	...	standardna deviacija, standardni odklon
SMAC	...	drugi mitohondrijski aktivator kaspaz (angl. second mitochondria-derived activator of caspases)
SNARE	...	topni proteinski receptorji, občutljivi na N-etilmalemid (angl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors)
SOD	...	superoksid dismutaza (angl. superoxid dismutase)
STS	...	staurosporin
TACE	...	encim, ki spreminja TNF (angl. TNF converting enzyme)
TAK1	...	s TGF β aktivirana kinaza 1 (angl. TGF β activated kinase 1)
tBID	...	cepljena oblika proteina Bid (angl. truncated Bid)
TCR	...	receptor T celic (angl. T-cell receptor)
Temed	...	N,N,N', N'-tetrametiletildiamin
Tempol/TE	...	4-hidroksi-2, 2, 6, 6-tetrametilpiperdin 1-oksil
TGF β	...	tumorski rastni dejavnik β (angl. tumour growth factor β)
TNF	...	dejavnik tumorske nekroze (angl. tumour necrosis factor)
TOR	...	tarča rapamicina (angl. target of rapamycin)
tot	...	totalni/popolni celični lizat
TRADD	...	protein, vezan na receptor TNF z domeno DD (angl. TNF receptor-associated death domain protein)
TRAF-1/2	...	dejavnik 1/2, povezan z receptorjem TNF (angl. TNF-receptor-associated factor 1/2)
TRAIL	...	ligand, podoben TNF, ki sproži apoptozo (angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
Tris	...	tris(hidroksimetil)aminometan
TritonX-100	...	oktilfenoletoksilat
TWEAK	...	šibek sprožilec apoptoze, podoben TNF (angl. TNF-like weak inducer of apoptosis)
Tween-20	...	polisorbat-20
ULK	...	UNC51 podobna kinaza (angl. UNC51-like kinase)
UPS	...	ubikvitin proteasomalni sistem (angl. ubiquitin proteasomal system)
UVRAG	...	tumor supresorski gen, povezan z odpornostjo na UV sevanje (angl. UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene)
VDAC	...	napetostno občutljiv anionski kanal (angl. voltage-dependent anion channel)
VMP1	...	protein 1 na membrani vakuole (angl. vacuole membrane protein 1)
XIAP	...	inhibitor apoptoze, vezan na kromosom X (angl. X-linked inhibitors of apoptosis)
zVAD	...	benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon

Uvod

1.1 Celična smrt

Za pravilen razvoj in vzdrževanje večceličnih organizmov je ključnega pomena ravnotežje med celično delitvijo in smrtjo. Porušenje te homeostaze lahko vodi v razvoj različnih patoloških stanj, kot so nepravilna embriogeneza, rakava obolenja, nevrodegenerativne bolezni, avtoimunska obolenja itd. (Galluzzi in sod., 2012; Green in sod., 2016).

Zadnjih nekaj let je prineslo izredno revolucijo v pojmovanju oblik celične smrti in njihovem razumevanju. Odbor za nomenklaturu celične smrti (angl. Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD), ki je prvič objavil članek o klasifikaciji celične smrti leta 2009, je kot mrtve celice opredelil tiste celice, ki imajo nepopravljivo poškodovano in prepustno membrano ter so bile v celoti razgrajene (Galluzzi in sod., 2018; Kroemer in sod., 2009). Celična smrt pa je bila razdeljena na nenamerno (angl. accidental cell death) in regulirano (angl. regulated cell death). Nenamerna celična smrt je običajno posledica izpostavitve ekstremnim fizikalno-kemijskim ali mehanskim dražljajem, ki povzročijo takojšnje strukturne okvare. Regulirana celična smrt pa je genetsko zapisan mehanizem, na katerega lahko vplivamo bodisi s farmakološkimi bodisi genetskimi dejavniki in se sproži kot del fizioloških programov ali pa prilagoditev na motnje v zunajceličnem ali znotrajceličnem mikrookolju. Morfološke in biokemijske značilnosti, ki spremljajo različne oblike celične smrti, lahko uporabimo za razvrščanje v določene podtipе, kot so: intrinzična apoptoza, ekstrinzična apoptoza, nekroptoza, ferroptoza, piroptoza, partanatos, entoza, NEToza, lizosomska celična smrt, itd. (Galluzzi, Bravo-San Pedro, in sod., 2016; Kroemer in sod., 2009).

1.1.1 Apoptoza

Apoptoza je oblika programirane celične smrti, ki je bila prvič opisana leta 1972 (Kerr in sod., 1972) in ima kot biološki proces vodilno vlogo pri embrionalnem razvoju, pravilnem delovanju imunskega sistema in vzdrževanju tkivne homeostaze (Arya in White, 2015; Fuchs in Steller, 2011).

Apoptozo lahko sprožijo zunanji (ekstrinzični) ali pa notranji (intrinzični) signali. Sam proces je aktivna oblika celične smrti, ki jo lahko od ostalih oblik celične smrti ločimo tudi na podlagi morfoloških značilnosti, ki vključujejo spremembo oblike celice, zmanjšanje celičnega volumna, fragmentacijo jedra (karioreksis), kondenzacijo kromatina (piknoza), spremembe citoplazemskih organelov, naluknjanje zunanje mitohondrijske membrane (angl. mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), brstenje celične membrane, nastanek apoptotskih teles, izpostavitve fagocitoznih označevalcev (npr. fosfatidilserina in DAMPs, angl. danger-associated molecular patterns). Med ključne biokemijske značilnosti pa spada aktivacija kaspaz in drugih katabolnih hidrolitičnih encimov, kot so DNAze (Green in sod., 2016; Kroemer in sod., 2009; Marino in sod., 2014).

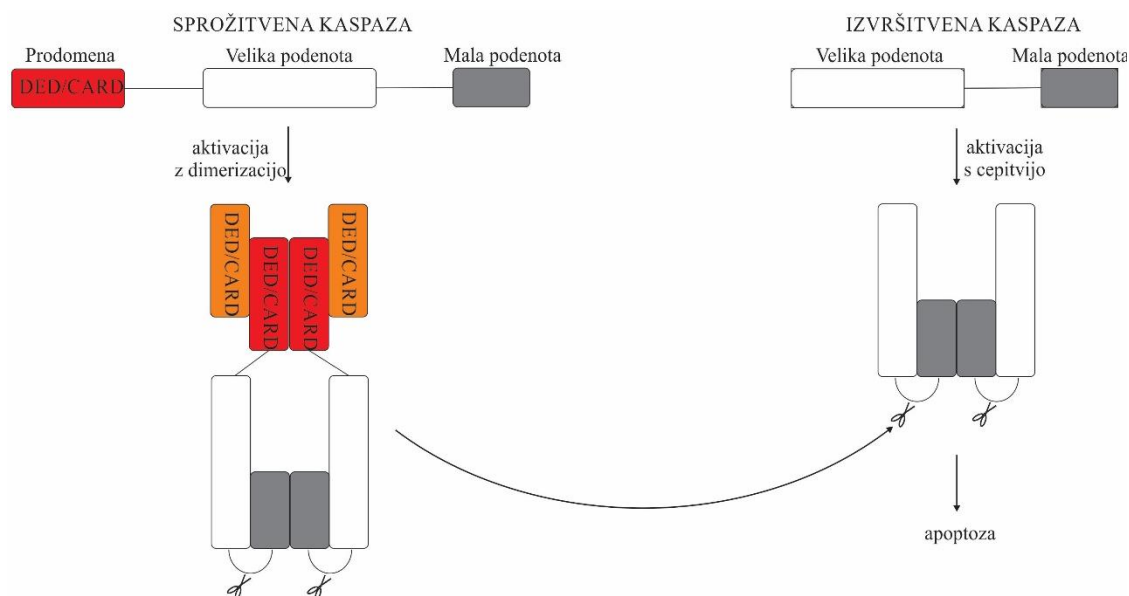
1.1.1.1 Kaspaze

Neodvisno od sprožilnega dejavnika apoptozo vedno regulirajo proapoptotske kaspaze, ki so cisteinske proteaze in so v celici vedno prisotne kot neaktivni zimogeni (Green in sod., 2016). Vloga kaspaz pri celični smrti je bila najprej dokazana v modelnem organizmu *Caenorhabditis elegans*, kjer kaspaza Ced-3 sproži apoptozo. Nadaljnje raziskave so pokazale, da v bolj kompleksnih organizmih število kaspaz naraste, vendar so evolucijsko povezane (Parrish in sod., 2013). Glede na fiziološko funkcijo poznamo še inflamatorne ali provnetne kaspaze, med katere prištevamo kaspaze 1, 4, 5, 11 in 12 (Fuchs in Steller, 2011; Shalini in sod., 2015). Najnovejše raziskave pa kažejo, da imajo tudi proapoptotske kaspaze vpliv na vnetni/imunski odziv. Kot primer lahko vzamemo kaspazo 8, ki naj bi aktivirala kaspazo 1, ko je inhibiran NF- κ B; poleg tega naj bi spodbujala naravno imunost z vplivanjem na sproščanje interleukinov IL-1 β in IL-18 (Galluzzi, Lopez-Soto, in sod., 2016).

Proapoptotske kaspaze so razdeljene v dve podskupini: sprožitvene ali apikalne (kaspaze 2, 8, 9 in 10) in izvršitvene ali efektorske kaspaze (kaspaze 3, 6 in 7). Sprožitvene kaspaze imajo poleg velike in majhne podenote, ki sta na C-koncu, še domeno, ki rekrutira kaspaze (angl. caspase-recruitment domain, CARD), ali pa efektorsko domeno smrti (angl. death effector

domain, DED). Domena CARD ali pa domena DED sta na N-koncu in sta ključni za aktivacijo preko dimerizacije (slika 1). Aktivacija kaspaz 8 in 10 poteče na signalnem kompleksu, ki sproži smrt (angl. death-inducing signalling complex, DISC), kaspaza 9 za aktivacijo izrabi kompleks, imenovan apoptosom, medtem ko poteče aktivacija kaspaze 2 na PIDDosomu (Connolly in sod., 2014; Parrish in sod., 2013; Shalini in sod., 2015). Po aktivaciji sprožitvene kaspaze proteolitsko cepijo neaktivne dimere izvršitvenih kaspaz in posledično pride do izoblikovanja katalitskega mesta. Preden postane kaspaza popolnoma aktivna in stabilna, običajno poteče še postopek zorenja, ki vključuje odstranitev prodomene ali cepitev med domenama. Katalitsko aktivne kaspaze so običajno heterotetrameri, sestavljeni iz dveh velikih in dveh majhnih podenot (Green in Llambi, 2015; Pop in Salvesen, 2009).

Z uporabo proteomskih analiz je bilo določenih že več kot 400 specifičnih substratov kaspaz. Najbolje poznani med njimi so citoplazemski proteini (npr. aktin, adherin, keratin), jedrni proteini (lamin A in B), proteini, potrebni za popravilo DNA (PARP, DNA-PK), prenašalci signalov (citokini, Bcl-2) in proteini celičnega cikla ter delitve (p21, p27) (Alenzi in sod., 2010).



Slika 1: Organizacija domen in mehanizem aktivacije kaspaz. Sprožitvene kaspaze so prisotne v celici kot neaktivni zimogeni in se aktivirajo z dimerizacijo. Sestavljene so iz prodomene (DED ali CARD), velike in majhne podenote. Izvršitvene kaspaze pa se aktivirajo s cepitvijo med podenotama. Slika je prirejena po (Green in Llambi, 2015).

Nekatere študije so pokazale, da so proapoptotske kaspaze vključene tudi v drugih oblikah celične smrti, npr. nekroza, piroptoza in mitotska katastrofa, in v druge procese, ki niso neposredno povezani s celično smrtjo, kot so diferenciacija različnih celic, embriogeneza, gibljivost, proliferacija T-celic, regulacija celičnega cikla itd. (Fuchs in Steller, 2011; Shalini in sod., 2015).

Aktivnost kaspaz mora biti natančno regulirana. Regulacija lahko poteka:

- na transkripcijski ravni – alternativno izrezovanje ali pa metilacija gena za kaspazo 8, alternativno izrezovanje gena za kaspazo 9, aktivacija transkripcijskih dejavnikov (p53 in E2F1);
- na sintezni ravni – v celici prisotne kot zimogeni;
- na posttranslacijski ravni – fosforilacija in nitrozilacija (npr. znižana aktivnost kaspaze 9), ubikvitinacija (kaspazo 9 XIAP označi za razgradnjo, poliubikvitinacija kaspaze 8 in agregacija s proteinom p62 pa poveča njeno aktivnost);
- preko neposredne ali posredne interakcije z drugimi proteini – p53, CrmA, FLIP, IAPs in proteini družine Bcl-2 (Fuchs in Steller, 2011; Parrish in sod., 2013; Shalini in sod., 2015).

Nepravilnosti v regulaciji se odražajo v različnih bolezenskih stanjih. Inhibicija proapoptotskih kaspaz je povezana z razvojem rakavih obolenj, prekomerna aktivacija pa privede do nevrodegenerativnih sprememb. Znižana aktivnost vnetnih kaspaz ima pomembno vlogo pri povešani občutljivosti na okužbe, medtem ko povišana aktivnost pospešuje vnetje (McIlwain in sod., 2013).

1.1.1.2 Intrinzična (mitohondrijska) pot apoptoze

Intrinzična (notranja/mitohondrijska) pot apoptoze je najbolj pogosto sprožena oblika apoptoze pri vretenčarjih. Sprožijo jo lahko različni dejavniki, kot so poškodba DNA, pomanjkanje rastnih dejavnikov, stres endoplazemskega retikuluma itd. (Zamaraev in sod., 2015). Ključni dogodek intrinzične poti apoptoze predstavlja permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane (angl. mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) in je točka brez povratka (slika 2) (Green in Llambi, 2015).

Glavni regulatorni proteini MOMP so proteini iz družine limfomskih-2 celic B (angl. B-cell lymphoma 2, Bcl-2). Le-te delimo glede na vlogo na proapoptotske (iniciatorji/začetnik in efektorji) in antiapoptotske (varuhi) ali glede na število homolognih Bcl-2 (BH1-4) domen (tabela 1). V normalno delujočih celicah so po večini vezani na mitohondrijsko membrano, le Bax je v citosolu. Najdemo pa jih tudi na membrani endoplazemskega retikuluma in jedrni lamini. Proteini iz družine Bcl-2 nimajo zgolj vloge v apoptozi, ampak sodelujejo tudi pri vzdrževanju ravnovesja kalcijevih ionov, avtofagiji, fiziji in fuziji mitohondrijev ter drugih celičnih procesih (Czabotar in sod., 2014; Green in Llambi, 2015; Lopez in Tait, 2015; X. Wang in sod., 2011).

Ob izpostavitvi celičnemu stresu lahko proteini z enojno BH3 domeno delujejo kot aktivatorji, saj neposredno sprožijo proapoptotske dejavnike ali pa izničijo delovanje antiapoptotskih proteinov (npr. interakcija med Bad ali Bim in Bcl-2), ko posredno prispevajo k apoptozi. Najverjetneje pa se prepletata oba modela uravnavanja. Proteini tBid, Bad, Bim in Puma so tako nujno potrebni za aktivacijo Bak in Bax, ki po homo-oligomerizaciji tvorita MOMP. Za tvorbo por nista nujno potrebna oba. Potek MOMP ni še popolnoma poznan, vendar naj bi prišlo do povečanja membranske napetosti in ukrivljenosti zunanje membrane, ko naj bi se stranske verige Bax oligomerov vrinile med lipidne glave. Bak pa naj bi k tvorbi por prispeval zgolj z oligomerizacijo; število molekul v oligomeru pa naj bi določalo velikost por (Czabotar in sod., 2014; Galluzzi, Kepp, in sod., 2016; Shamas-Din in sod., 2013).

Proteini iz družine Bcl-2 imajo pomembno vlogo pri regulaciji celične smrti, zato je njihovo pravilno uravnavanje ključno. Antiapoptotski proteini imajo kontrolne mehanizme na transkripcijski in posttranslacijski ravni (npr. Mcl1 se razgradi v ubikvitin proteosomskem sistemu ali pa ga fosforilirajo kinaze MAP in apoptoza poteče). Prav tako so na transkripcijski in posttranskripcijski ravni regulirani proteini z enojno BH3 domeno (Green in Llambi, 2015).

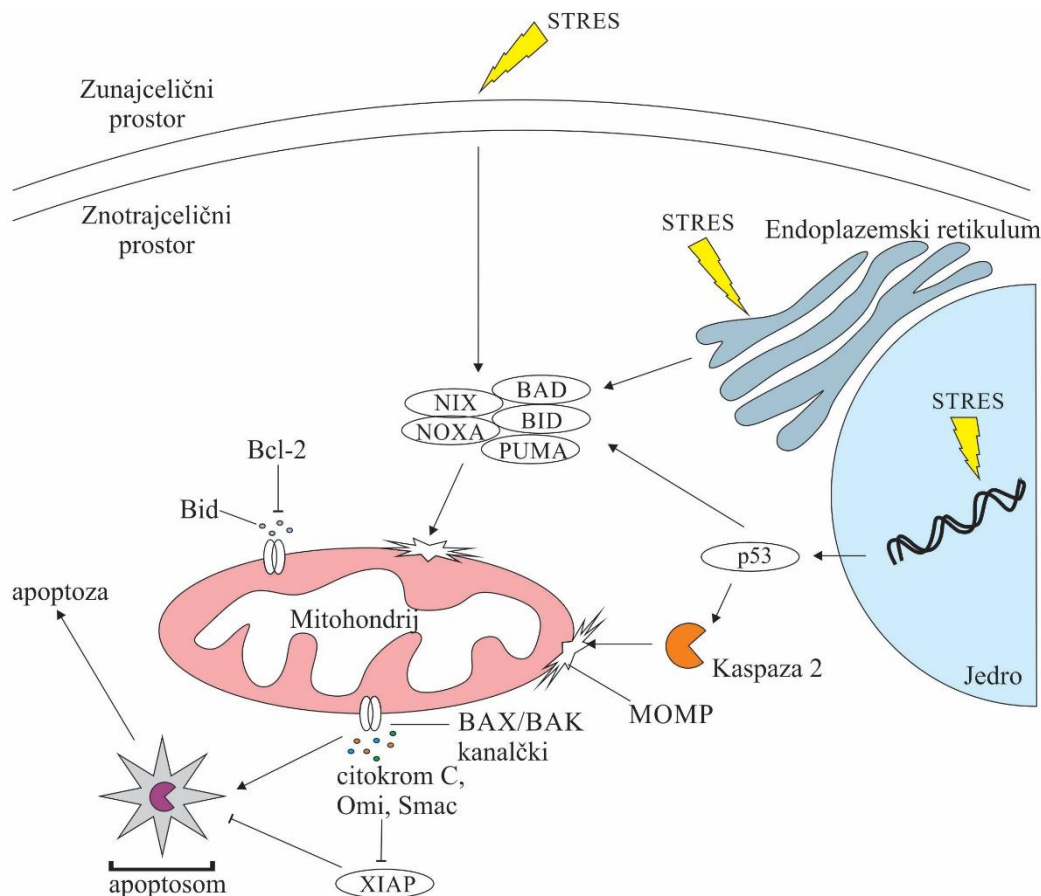
Tabela 1: Delitev proteinov družine Bcl-2. Povzeto po (Delbridge in sod., 2016)

Vloga	Proteini	BH domene
Antiapoptotski proteini	Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1, Bcl-W	BH1-4
Proapoptotski proteini	Bax, Bak, Bok	BH1-4
	BID, Bad, Bim, Puma, Noxa	BH3

Posledica MOMP je sproščanje citokroma c v citoplazmo, kar predstavlja proapoptotski signal (slika 2). Citokrom c je vezan na notranjo mitohondrijsko membrano preko molekul fosfolipida kardiolipina in skrbi za prenos elektronov med kompleksoma III in IV v dihalni verigi. Ko se kardiolipin oksidira (najverjetneje z vodikovim peroksidom), se citokrom c odcepi (Lopez in Tait, 2015; Zamaraev in sod., 2015). Poleg citokroma c se v citoplazmo izlijejo še dejavniki, ki sproži apoptozo (angl. apoptosis inducing factor, AIF), endonukleaza G, SMAC/Diablo in serinska proteaza HtrA2/Omi (angl. high temperature requirement protein A2), ki pripomoreta k apoptozi z vezavo ali razgradnjo proteinov XIAP (Czabotar in sod., 2014; Green in Llambi, 2015; Lopez in Tait, 2015). Homodimer SMAC/Diablo se po sprostitvi iz mitohondrija v citosol veže na IAP, ki se odstranijo preko UPS, in kaspaze se lahko aktivirajo. Na aktivacijo kaspaz pa vpliva še ravnovesje med IAP in SMAC/Diablo. XIAP deluje kot inhibitor kaspaz 9, 7 in 3 ter poleg cIAP1/2 vpliva na zmanjšanje koncentracije SMAC/Diablo, saj se te regulatorne molekule po ubikvitinaciji razgradijo v proteasomu (Galluzzi, Kepp, in sod., 2016; Galluzzi in sod., 2018; Martinez-Ruiz in sod., 2008).

Citokrom c se v citoplazmi veže na domeno WRD (angl. WD40 repeat domain) dejavnika 1 aktivacije apoptotne proteaze (angl. apoptotic protease-activating factor 1, Apaf-1), kar predstavlja osnovo za nastanek heptamernega kompleksa – apoptosoma (slika 2). Apaf-1 ima še domeno NOD, ki je potrebna za vezavo nukleotidov (ADP ali ATP) in oligomerizacijo. Domena CARD proteina Apaf-1 pa je prosta, da se preko nje veže prokaspaza 9 (Reubold in Eschenburg, 2012). Kaspaza 9 se lahko aktivira preko dveh modelov: v prvem apoptosom služi kot mesto za povečanje koncentracije prokaspaze 9, kar omogoči cepitev kaspaze; v drugem (alosteričnem) modelu pa naj bi apoptosome aktiviral kaspazo 9 preko konformacijskih sprememb (Shakeri in sod., 2017). Nastala aktivna kaspaza se sprosti z vezavnega mesta, na katerega se ponovno veže

prokaspaza. V enem ciklu je lahko istočasno vezanih od pet do sedem prokaspaznih molekul, vendar sta istočasno aktivni zgolj ena ali dve kaspazi. Ko se kaspaza 9 aktivira, proteolitsko cepi izvršitveni kaspazi 3 in 7, ki interagirata z Apaf-1. Kaspaza 3 in kaspaza 9 vplivata na proteolitsko aktivnost apoptosoma, saj se njuni vezavni mesti prekrivata in pride do nastanka hibridnega apoptosoma. Poleg tega lahko kaspaza 3 cepi Apaf-1, kar onemogoči vezavo kaspaze 9 (Galluzzi in sod., 2018; Zamaraev in sod., 2015).



Slika 2: Shema poteka intrinzične (mitohondrijske) poti apoptoze. Slika je prirejena po (Marino in sod., 2014).

Delovanje apoptosoma je regulirano, da ne pride do nehotene celične smrti. Molekule tRNA, ATP in kalijeve ioni inhibirajo interakcije med citokromom c in Apaf-1 ter tako preprečijo nastanek apoptosoma. Na vezavo ATP na Apaf-1 negativno vplivajo kalcijevi ioni, medtem ko protein PHAP le-to spodbuja. Prav tako oligomerizacijo inhibirajo stresni proteini (angl. heat shock protein, Hsp) in nekatere kinaze, ki s fosforilacijo inhibirajo nastanek apoptosoma ali pa njegovo delovanje. Na aktivnost apoptosoma vpliva tudi raven prokaspaze 9, ekspresijo katere regulira protein PCIDI (Green in Llambi, 2015; Tait in Green, 2013).

Ko v celici pride do nastanka MOMP in so kaspaze inhibirane, lahko celica umre po poti, neodvisni od kaspaz. To je posledica nepravilno delujočih mitohondrijev ter pomanjkanja ATP in sproščanja citotoksičnih dejavnikov (Lartigue in sod., 2009; Yadav in Chandra, 2014).

V nekaterih primerih pa MOMP ne sproži celične smrti, npr. ko ni poškodovanih veliko/dovolj mitohondrijev, v rakavih in postmitotičnih celicah. Celice v ta namen bodisi preprečijo MOMP bodisi zavrejo delovanje kaspaz (Reubold in Eschenburg, 2012).

1.1.1.3 Ekstrinzična (receptorska) pot apoptoze

Ekstrinzično (zunanjo/receptorsko) pot apoptoze sproži vezava ligandov na receptorje smrti, ki so izraženi na površini celice. Receptorji smrti iz družine receptorjev TNF (angl. tumour necrosis factor) so transmembranski proteini, pri katerih je C-konec znotrajcelični del in N-konec zunajcelični del. Znotrajcelični del ima domeno smrti (angl. death domain, DD), zunajcelični del pa je bogat s cisteini, ki so potrebni za trimerizacijo receptorja in vezavo liganda (Cabal-Hierro

in Lazo, 2012; Guicciardi in Gores, 2009). Poznamo različne receptorje smrti, vendar med najbolj proučene prištevamo:

- Fas, na katerega se veže ligand FasL/CD95L/CD178;
- TRAILR 1/2 (angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1/2) s pripadajočim ligandom TRAIL/Apo-2L/TNFSF10; in
- TNFR (angl. tumour necrosis factor receptor), ki se veže s TNF in limfotoksinom α /LT.

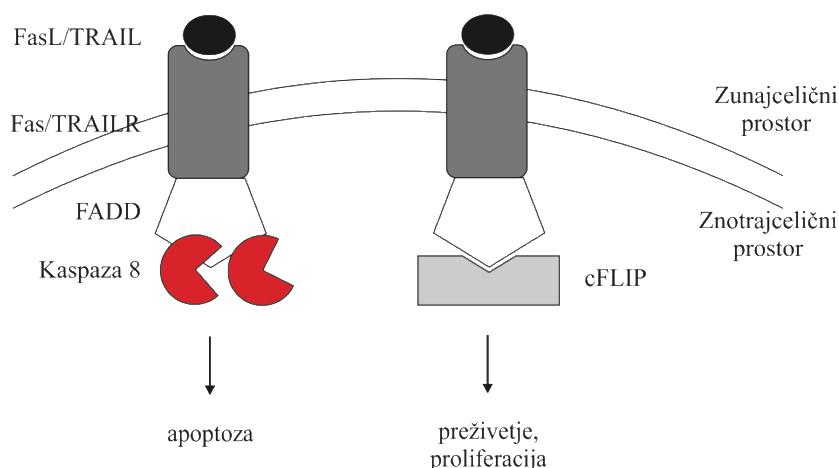
Med receptorje uvrščamo še DR3/Apo-3/TRAMP in DR6/TNFRSF21, ki pa sta slabša prenašalca apoptotskega signala. Nekateri receptorji se od ostalih razlikujejo po tem, da nimajo domene smrti oz. je krajša kot pri ostalih, zato ti delujejo zaviralno in so označeni kot vadbene receptorji (angl. decoy receptors). Znana vadbena receptorja sta membranska DcR1/TRAILR 3 in DcR2/TRAILR 4 ter prosta/nevezana DcR3 in osteoproteogerin, ki po vezavi liganda ne sprožijo nadaljnje proapoptotske kaskade (Guicciardi in Gores, 2009; Merino in sod., 2006; von Karstedt in sod., 2017).

Za razliko od TNFR1, ki v večini primerov sproži preživetveno pot, vezava liganda na Fas in TRAILR1 vodi običajno v celično smrt (slika 3). Interakcija med ligandom in receptorjem sproži vezavo adapterskega proteina FADD (angl. Fas-associated protein with death domain) preko DD. Adapterski proteini imajo poleg domene DD še domeno DED, ki je potrebna za vezavo kaspaze 8 ali 10. Receptor, adapterski protein in kaspaza tvorijo tako imenovani kompleks DISC, ki je potreben za aktivacijo sprožitvenih kaspaz. Temu sledi aktivacija izvršitvenih kaspaz, kar vodi v celično smrt (Dickens in sod., 2012; Green in sod., 2016; Guicciardi in Gores, 2009).

cFLIP (angl. cellular FLICE/caspase 8-like inhibitory protein), poznan tudi kot Casper, iFLICE, FLAME-1, CLARP ali usurpin, ima ključno regulatorno vlogo pri poteku ekstrinzične poti apoptoze. Poznanih je 13 različnih spojitenih variant, vendar se sintetizirajo zgolj:

- cFLIP_L, 55 kDa, ki je strukturno podoben prokaspazi 8 (dve domeni DED in kaspazi podobna domena),
- cFLIP_S, 26 kDa in
- cFLIP_R, 24 kDa, ki oba vsebujeta dve domeni DED, vendar imata krajši C-terminalni konec kot cFLIP_L.

V kolikor se v kompleks DISC veže protein cFLIP, pride do inhibicije sprožitvenih kaspaz in mogoča je aktivacija preživetvenih poti ter proliferacija celic. cFLIP_L tvori s prokaspazo 8 heterodimere, ki kljub delnemu procesiranju ostanejo vezani na DISC, zato ne pride do prenosa apoptotskega signala. cFLIP_S pa neposredno prepreči dimerizacijo prokaspaze 8 na kompleks, kar lahko med drugim omogoči akumulacijo kaspaze RIP1 in sprožitev nekroptoze (Galluzzi in sod., 2018; Shirley in Micheau, 2013; Subramaniam in sod., 2013).



Slika 3: Signaliziranje preko receptorjev Fas in TRAILR. Slika je prirejena po (Green in Llambi, 2015).

Kaspaze se pri ekstrinzični apoptozi lahko aktivirajo na dva različna načina. V celicah tipa I lahko kaspaza 8 neposredno aktivira izvršitveni kaspazi. V celicah tipa II pa je potrebna ojačitvena zanka, ki vključuje cepitev proteina Bid in posledično sproščanje citokroma c iz mitohondrijev. Temu sledi tvorba apoptosoma in aktivacija kaspaze 9, ki lahko nadalje aktivira kaspazi 3 in 7. Ključna razlika med celicami tipa I in II naj bi bila v prisotnosti znotrajceličnega inhibitorja apoptoze XIAP (Guicciardi in Gores, 2009; McIlwain in sod., 2013; Mohamed in sod., 2017).

1.1.2 Signalizacija preko receptorja TNF

Dejavniki tumorske nekroze (TNF) so odkrili leta 1984 in je del družine TNF, v katero prištevamo receptorje in ligande. TNF je citokin s številnimi biološkimi učinki. Znano je, da povzroča vnetje in aktivira levkocite. Poleg tega lahko sproži endotelijske adhezijske molekule, avtokrino aktivira in povzroči diferenciacijo makrofagov, služi kot obramba pred znotrajceličnimi patogeni, deluje kot ko-mitogen na T- in B-limfocite, regulira hematopoezo, deluje kot rastni dejavnik, ima protrombotično delovanje in sproži izločanje drugih citokinov iz celic, ki sodelujejo pri imunskemu odgovoru. Njegov nastanek in delovanje morata biti natančno regulirana, saj bi v nasprotnem primeru prišlo do razvoja različnih bolezni, kot so kardiovaskularne, nevrološke, pljučne, avtoimune in metabolne bolezni ter različne vrste raka (Fiers in sod., 1999; Male, 2012; Walczak, 2011).

TNF v največji meri proizvajajo imunske celice kot trimerni transmembranski protein. TACE (angl. TNF converting enzyme) lahko membransko vezani protein cepi v topno obliko.

Znana sta dva receptorja TNF:

- TNFR1 je 55 kDa velik, izražen v večini celic, lahko ga aktivirata membransko vezani ali pa topni ligand TNF protein in ima domeno smrti na C-terminalnem delu;
- TNFR2 pa je velik 75 kDa in ga najdemo zgolj v hematopoetskih celicah (miociti, astrociti, T celice, endotelijske celice itd.), veže zgolj topno obliko liganda TNF ter nima domene smrti.

Na receptorja se poleg TNF vežeta tudi limfotoksin α in rastni dejavnik progranulin (Caballero in Lazo, 2012; Guicciardi in Gores, 2009; Varfolomeev in Vucic, 2018).

Ob vezavi na receptor TNFR1 na celični membrani se lahko sprožijo tri različne molekularne poti: aktivacija apoptotskih kaspaz in/ali nastajanje amiloidnih tvorbo – nekrosoma preko kompleksa II ali pa proliferacija oziroma preživetvena pot preko jedrnega dejavnika $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), ki predstavlja primarni odziv po nastanku kompleksa I (Male, 2012).

1.1.2.1 Preživetvena pot

Jedrni dejavnik $\kappa\beta$ (angl. nuclear factor $\kappa\beta$, NF- $\kappa\beta$) predstavlja družino evolucijsko ohranjenih transkripcijskih dejavnikov, ki sodelujejo pri aktivaciji imunskega sistema ob prisotnosti različnih dejavnikov (npr. virusi, bakterije, citokini in drugi vnetni dejavniki). V družino NF- $\kappa\beta$ spada pet proteinov: p50 (NF- $\kappa\beta$ 1), p52 (NF- $\kappa\beta$ 2), p65 (RelA), RelB in RelC. Vsi imajo skupno Rel homologno domeno (angl. Rel homology domain, RHD), ki je potrebna za vezavo na DNA. Poleg domene RHD pa imajo proteini še domene, na katere se vežejo regulatorne molekule. V normalnem stanju se vsi proteini nahajajo v citoplazmi kot homo- ali heterodimeri, nanje pa je vezan eden izmed inhibitorjev $\kappa\beta$ (angl. inhibitor of $\kappa\beta$, I $\kappa\beta$), kot so I $\kappa\beta\alpha$, I $\kappa\beta\beta$, I $\kappa\beta\delta$, I $\kappa\beta\zeta$ in drugi. Pomembno regulatorno vlogo imajo tudi kinaze I $\kappa\beta$ (angl. I $\kappa\beta$ kinase, IKK) - IKK α in IKK β in njuna regulatorna podenota IKK γ /NEMO (angl. NF- $\kappa\beta$ essential modulator). Aktivacija NF- $\kappa\beta$ lahko poteče po kanonični/kласični ali pa nekanonični/alternativni poti (Gilmore, 2006; Hinz in Scheidereit, 2014).

Kanonična pot poteče v primeru vnetja in prirojeni imunosti. Eden izmed najbolj raziskanih sprožilcev je citokin TNF, ki se veže na TNFR1 (slika 4). Ob vezavi liganda na receptor se preko DD domene v kompleks veže še TRADD, ki interagira z RIP1 in TRAF2. Nastali trimeri TRAF2 privabijo cIAP1/2 in LUBAC, ki sta ubikvitinski ligazi; RIP1 pa privabi TAK1 (angl. transforming growth factor- β activated kinase) in IKK kompleks preko proteina NEMO. Skupek proteinov tvori signalni kompleks I. Kot posledica fosforilacije se IKK kompleks aktivira in prenese fosfatno skupino na inhibitor I $\kappa\beta\alpha$, ki se po ubikvitinaciji razgradi preko UPS. Procesirani kompleks NF- $\kappa\beta$ (p65:p50) se prenese v jedro, kjer pride do prepisovanja genov za imunski odziv in preprečevanje celične smrti, sprožene s TNF. Sprožitev preživetvene poti je izredno hitra, saj je že petminutna izpostavitve TNF zadostna, da se IKK aktivira po 3–5 minutah, inhibitor se razgradi po desetih minutah, do prenosa NF- $\kappa\beta$ v jedro pa pride v pol ure. Kljub vsemu pa je potrebna daljša izpostavitve TNF, da se začnejo prepisovati provnetni tarčni geni. Poleg tega imajo pomemben vpliv tudi zgoraj opisane posttranslacijske spremembe (Dondelinger in sod., 2016; S. Ghosh in Dass, 2016; Hayden in Ghosh, 2014; Walczak, 2011).

Navsezadnje je pomembna tudi negativna regulacija kompleksa NF- $\kappa\beta$, saj sicer pride do različnih vnetnih stanj in razvoja rakavih obolenj. Pri prepisovanju gena za I $\kappa\beta$, ki se prične izražati in kopičiti v citoplazmi, nastane negativna povratna zanka inhibicije NF- $\kappa\beta$. Poleg I $\kappa\beta$ so doslej raziskani še drugi zaviralni mehanizmi, ki vključujejo:

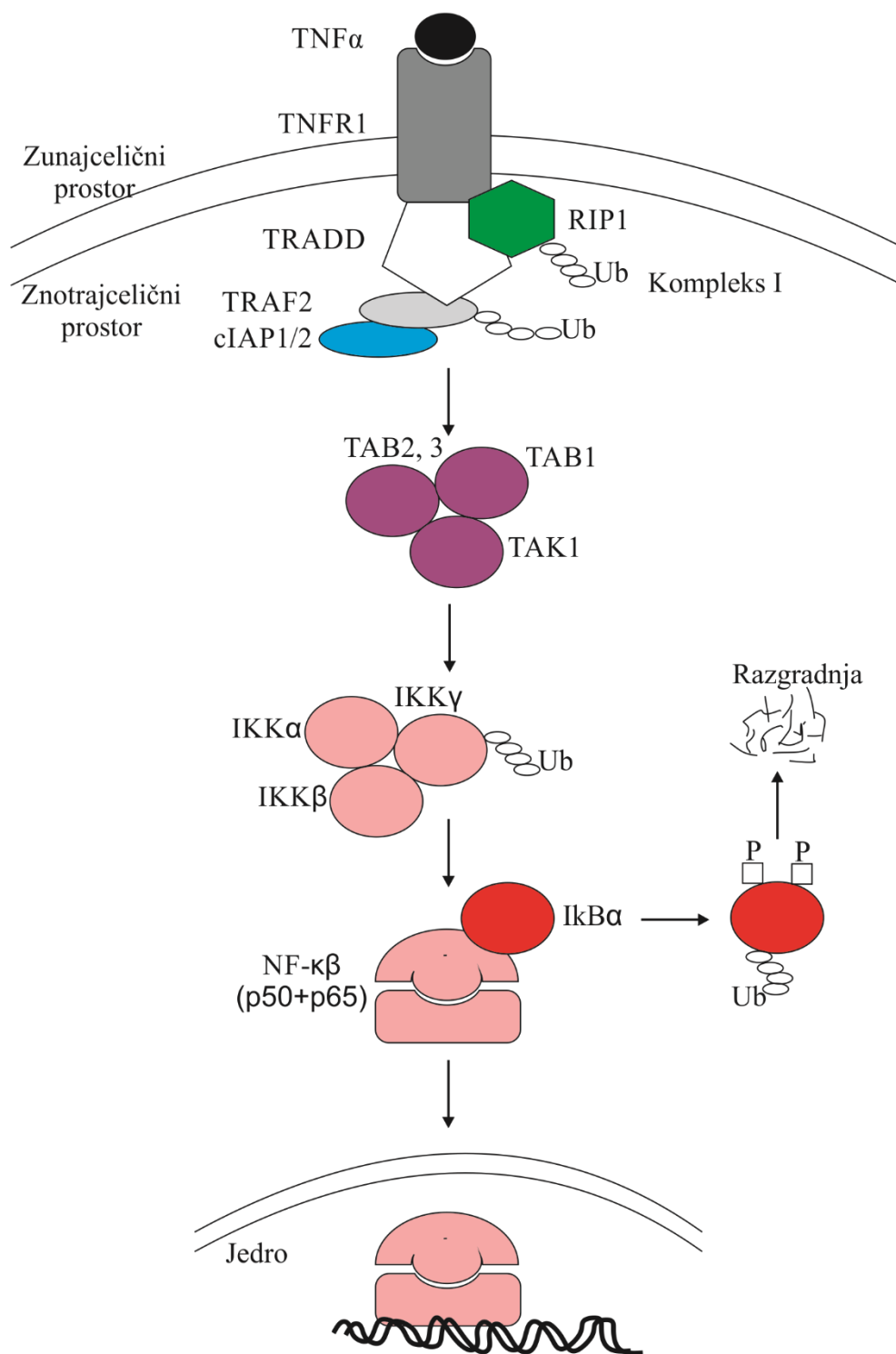
- zniževanje koncentracije receptorja,
- povišano koncentracijo proteina A20, ki naj bi vplival na ubikvitinacijo,

- vezavo histonske deacetilaze na aktiven kompleks NF- κ B v jedru, kar povzroči zaustavitev prepisovanja,
- vezavo PIAS1 in PIASy na p65, ki prepreči nalaganje NF- κ B na DNA in naj bi imel pomembno vlogo pri določevanju meje začetka prepisovanja tarčnih genov (Hayden in Ghosh, 2014; Hinz in Scheidereit, 2014).

Nekanonično pot aktivirajo zgolj specifični receptorji iz družine TNF receptorjev, kot so LT β R, CD40, BAFFR, RANK, TNFR2 in CD27. Ključni razliki med kanonično in nekanonično potjo sta v tem, da pride do tvorbe drugega kompleksa NF- κ B (pri nekanonični poti nastane p52:RelB, pri kanonični poti pa p65:p50) in da pot poteče neodvisno od proteinov IKK β in NEMO. Ključni korak pri tej poti je procesiranje prekursorskega proteina p100 v NF- κ B2 (p52). Vlogo glavne signalne molekule pa ima NF- κ B inducibilna kinaza (angl. NF- κ B inducible kinase, NIK), ki skupaj s kinazo IKK α vpliva na ubikvitinacijo in procesiranje p100. Kinaza NIK je vedno aktivna, zato je potrebna dodatna raven uravnavanja. V normalnih razmerah se TRAF2/3 in cIAP1/2, ki sta ubikvitinski ligazi E3, vežeta na kinazo NIK. TRAF2/3 služita kot proteinsko ogrodje za vezavo cIAP1/2, ki označi NIK za razgradnjo v UPS.

V kolikor pride do ustreznega signala (npr. CD40L se veže na CD40), se spremeni afiniteta proteinov TRAF in posledično se kinaza NIK stabilizira, kar vodi v sprožitev nekanonične preživetvene poti. Da pride do stabilizacije kinaze NIK, se mora kompleks TRAF2/3 vezati na receptor namesto na NIK. K temu dodano prispeva razpad kompleksa TRAF2/3 in vezava TRAF2 s TRAF1/2 in cIAP1/2; pri tem pa se TRAF3 po ubikvitinaciji razgradi v UPS. Ko se NIK nakopiči, se avtofosforilira in nato prenese fosfatno skupino na IKK α . Aktiviran IKK α fosforilira del p100, vezan na RelB. Na fosforiliran p100 se nato vežejo ubikvitinske verige in p100 z delnim procesiranjem v UPS dozori v p52. Kompleks p52:RelB se nato veže na DNA. Pri nekanonični poti se tudi sproži negativna povratna zanka, ko IKK α fosforilira NIK na C-terminalnem delu, ki se nato razgradi v UPS neodvisno od TRAF3 (Cildir in sod., 2016; Hayden in Ghosh, 2014).

Potek poti naj bi bil počasnejši kot pri kanonični poti, saj sta pomembna omejitvena dejavnika od signala odvisna razgradnja proteina TRAF3 in *de novo* sinteza ter akumulacija kinaze NIK. Nekanonična pot je pomembna zlasti pri razvoju T- in B-celic ter njihovem zorenju, limfoidni organogenezi in diferenciaciji osteoklastov (Cildir in sod., 2016; Gilmore, 2006; Hayden in Ghosh, 2014; S. C. Sun, 2012).



Slika 4: Kanonična pot aktivacije NF- κ B. Povzeto po (Hayden in Ghosh, 2014).

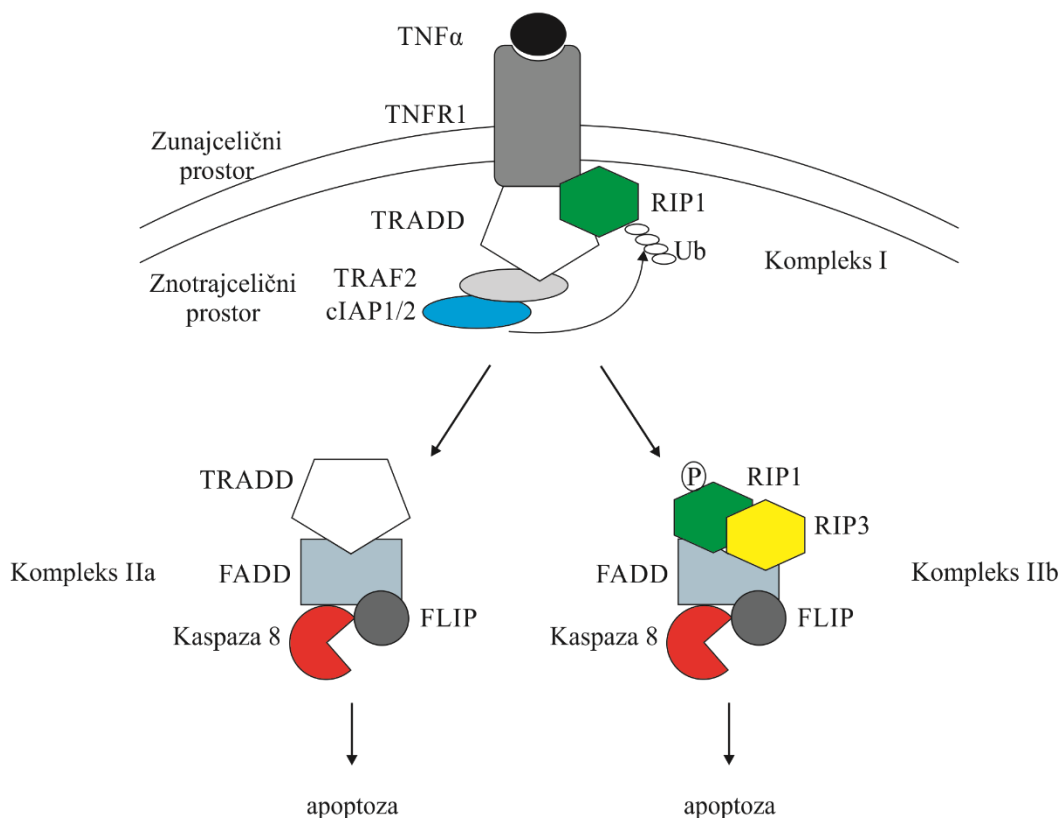
1.1.2.2 S TNF sprožena apoptoza

Po vezavi TNF na receptor TNFR1 pride do konformacijske spremembe in vezave adaptorskega proteina TRADD (angl. TNFR-associated death domain protein). Sprožitvene kaspaze se ne vežejo neposredno na adapter TRADD, ampak le-ta interagira še s proteinsko kinazo 1 (angl. receptor-interacting protein 1, RIP1), ubikvitinskima ligazama TRAF2 (angl. TNFR-associated factor) in cIAP1/2 (angl. cellular inhibitor of apoptosis 1/2). Če pride do destabilizacije kompleksa

I, se RIP1 in TRADD odcepita in predstavljata osnovo za nastanek kompleksa II (Green in Llambi, 2015; Nikolettou in sod., 2013).

Apoptoza lahko poteče preko kompleksa IIa oz. od TRADD odvisnega kompleksa (slika 5). Če je encim CYLD kinazo RIP1 deubikvitiniral, se na citosolni TRADD najprej preko domene DD veže FADD in nato še pro-kaspaza 8 ter FLIP_L. Homodimeri kaspaze 8 ali pa heterodimeri kaspaze 8 in FLIP lahko cepijo in deaktivirajo RIP1. Aktivna kaspaza 8 nato proteolitsko cepi nezrele kaspaze 3, 6 in 7 ali pa vpliva na prepustnost mitohondrijske membrane (Green in Llambi, 2015; Nikolettou in sod., 2013; Pop in sod., 2011; Vanden Berghe in sod., 2014).

Ko pa v celici primanjkuje molekul cIAP, nastane kompleks IIb/rioptosom/od RIP odvisen kompleks (slika 5). Ripoptosom tvorijo RIP1, RIP3, FADD in heterodimer FLIP_L s kaspazo 8. RIP1 in RIP3 inhibira kaspazni heterodimer in posledično poteče apoptoza (Vanden Berghe in sod., 2014; Varfolomeev in Vucic, 2018).



Slika 5: Sprožitelj apoptoze preko receptorja TNFR1. Po vezavi TNF nastane kompleks I. V kolikor je preživetvena pot inhibirana, lahko nastaneta kompleks IIa ali pa kompleks IIb, ki sta ključna za aktivacijo kaspaze 8. Povzeto po (Vanden Berghe in sod., 2014).

1.1.2.3 Nekroptoza

Nekroptoza je bila prvič omenjena leta 2005, čeprav so že pred letom 2000 ugotovili, da lahko TNF sproži tako apoptozo kot nekrozo v odvisnosti od tipa celic in da je za celično smrt sproženo s FasL v celicah Jurkat potrebna kinaza RIP1. Do leta 2012 pa so odkrili, da sta za njen potek ključni še kinaza RIP3 in psevdokinaza MLKL (Degterev in sod., 2005; Galluzzi in sod., 2018; He in sod., 2009; Holler in sod., 2000).

Nekroptoza je celična smrt, ki ima hkrati lastnosti apoptoze in nekroze. Tako apoptoza kot nekroptoza sta programirani obliki celične smrti, ki ju sproži vezava liganda na receptor smrti, vendar ostanejo pri nekroptozni kaspaze neaktivne. Morfološko pa je nekroptoza podobna nekrozi, saj organi in celice nabreknejo, jedro se deloma spremeni, vendar ostane DNA nefragmentirana. V zadnji stopnji pa pride do naluknjanja membran in izlitja celične vsebine v medceličnico. Sama celična smrt naj ne bi bila energetska potratna, vzbudi pa imunski odziv (Edinger in Thompson, 2004; Pasparakis in Vandenabeele, 2015; Vandenabeele in sod., 2010).

Doslej so bili identificirani različni sprožiteljci nekroptoze. Sem prištevamo TNF, FasL, TRAIL, TWEAK (angl. TNF-related weak inducer of apoptosis), genotoksični stres, poliklonalno

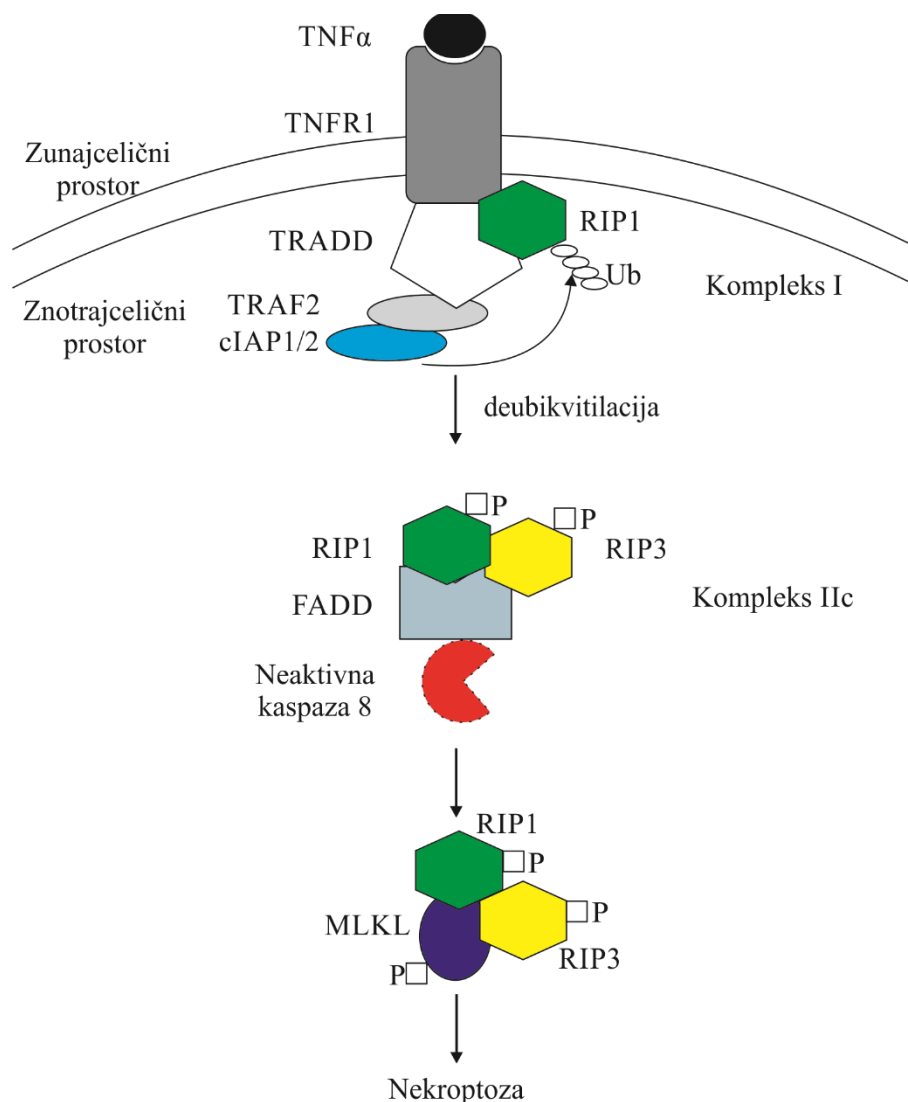
stimulacijo TCR (angl. T-cell receptor), nekatere kemoterapevtike (npr. obatoclax, ki je inhibitor proteinov iz družine Bcl-2), LPS in nekatere molekule PAMP (angl. pathogen-associated molecular patterns). Nekroptoza pa lahko poteče tudi neodvisno od vezave liganda na receptor, kot je v primeru virusne DNA. DAI (angl. DNA-dependent activator of IFN regulatory factors) prepozna dvoverižno virusno DNA in se nato preko RHIM domene veže na RIP3 ter spodbudi potek nekroptoze (Sosna in sod., 2016; Upton in sod., 2012; Vanden Berghe in sod., 2014).

Najbolje je opisan model TNF signaliziranja (slika 6). Po vezavi TNF na receptor nastane kompleks I, ki se internalizira po deubkvitinaciji RIP1 s CYLD (angl. cylindromatosis) ali pa A20 in nastane kompleks II. Aktivna kaspaza 8 cepi RIP1 in RIP3 ter tako prepreči potek nekroptoze. Če pa je kaspaza 8 v kompleksu II inhibirana ali pa pride do genske izgube FADD, poteče nekroptoza. Ključno vlogo pri tem imata kinazi RIP1, ki je vključena tudi v apoptozo in preživetveno pot, in RIP3, ki pa ima bolj specifično vlogo. Obe kinazi imata domeno RHIM (angl. RIP homologous interaction motif), preko katere sta povezani v kompleks IIc oz. nekrosom. Avtofosforilirana kinaza RIP1 aktivira RIP3, ki nato pripne fosfatne skupine na psevdokinazo MLKL (angl. mixed lineage kinase-like). MLKL se oligomerizira, prenese na plazemsko membrano in tam tvori pore, ki povzročijo pokanje celic. Natančen mehanizem delovanja MLKL še ni poznan. Predvidoma pa naj bi se vezal na fosfatidilinozitolne lipide in kardiolipin (de Almagro in sod., 2017; Degterev in sod., 2008; Degterev in Yuan, 2008; Dondelinger in sod., 2016; He in sod., 2009; L. Sun in sod., 2012; H. Wang in sod., 2014).

Prav tako niso pojasnjeni tudi ostali nekrozi podobni dogodki. Pri TNF sproženi nekroptozni pride do povišanja ROS, ki naj bi nastali kot posledica vpliva kinaze RIP3 na mitohondrije ter aktivacije glikogen fosforilaze (angl. glycogen phosphorylase, PYLG), glutamat-amonijske ligaze (angl. glutamate-ammonia ligase, GLUL) in glutamat dehidrogenaze 1 (angl. glutamate dehydrogenase 1, GLUD1), ki z oksidativno fosforilacijo pripomorejo k povišanju oksidativnega stresa. Prav tako je bilo dokazano, da pride do zvišanja ravni izražanja oksidaz NAPDH (zlasti Nox1, ki proizvaja superoksid). Kinaza JNK pa lahko ima dvojno vlogo, saj lahko celično smrt inhibira ali pa je vpeta v pozitivno povratno zanko pri nekrozi (povišani ROS sprožijo pronekrotično delovanje JNK in dodatno povišanje ROS). Mitohondriji naj bi bili povezani z nekroptozo tudi preko adenin nukleotidne translokaze (angl. adenine nucleotide translocase, ANT), ki je inhibirana in ne pride do sinteze ATP. Prav tako naj bi bila pri nastanku mitohondrijskih por vključena ciklofilin D (angl. cyclophilin D, CYPD) in napetostno občutljiv anionski kanal (angl. voltage-dependent anion channel, VDAC). V primeru TNF sprožene celične smrti naj bi pomembno vlogo imela encima PLA2 in LOX, ki naj bi vplivala na lipidno hidroksiperoksidacijo in posredno na naluknjanje membran organelov. PGAM5 (angl. phosphoglycerate mutase family member 5) ravno tako interagira s kinazo RIP3. PGAM5L deluje kot adapterski protein med nekrosomom in PGAM5S, ki je vezan na mitohondrijsko membrano. PGAM5 defosforilira Drp1, ki je ključen za fisijo/deljenje mitohondrijev, ki poteče med nekroptozo, čeprav so nedavne študije nasprotovale tej ideji, saj naj bi PGAM5 imel bolj zaščitno vlogo, ker naj bi spodbujal mitofagijo (Linkermann in Green, 2014; Lu in sod., 2016; Shen Han-Ming, 2014; Vanden Berghe in sod., 2014; Wu in sod., 2012).

Nastanek ripoptosoma in nekrosoma je strogo reguliran s posttranslacijskimi modifikacijami, vendar pri tem ostaja še veliko vprašanj. Ena izmed oblik je fosforilacija. Dondelinger in sodelavci so pokazali, da lahko IKK α /IKK β z dodajanjem fosfatne skupine inhibirata RIP1 aktivnost oz. zadržita RIP1 v kompleksu I ter tako preprečita celično smrt. Če je fosforilacija RIP1 inhibirana, le-ta tvori kompleks II skupaj s FADD in kaspazo 8 (Dondelinger in sod., 2015). Zelo pomembna posttranslacijska modifikacija pa je tudi ubikvitinacija. V raziskavi, ki so jo opravili de Almagro in sodelavci, je prikazano, da je za potek nekroptoze potrebna aktivna kinaza RIP1. Na podlagi rezultatov so tudi predpostavili, da ubikvitinacija dodatno stabilizira RIP1 v nekrosomu (de Almagro in sod., 2017). Pomembno vlogo pa imajo tudi druge ligaze E3, kot so LUBAC, cIAP1/2 in XIAP, ki z ubikvitinacijo označijo posamezne komponente ripoptosoma. Poleg tega naj bi ubikvitinacija aktivirala kompleks IKK, ki naj bi sprožil preživetveno pot preko NF- κ B. To je pa v nasprotju z deubikvitilazo CYLD, ki cepi ubikvitinske verige na RIP1 in s tem omogoči potek celične smrti. A20 pa s cepitvijo ubikvitinskih verig na RIP3 prepreči nekroptozo (de Almagro in sod., 2015; Dondelinger in sod., 2016; Shen Han-Ming, 2014).

Dobro poznavanje regulacije signalnih poti pri nekroptozni bi lahko imelo tudi terapevtski potencial, saj je nekroptoza povezana s številnimi patološkimi stanji. Vedno več študij nakazuje, da je nekroptoza vključena kot molekulska pot smrti pri ishemiji, travmah kemijske ali fizikalne narave, obolenjih gastrointestinalnega trakta, nevrodegenerativnih boleznih ter bakterijskih ali virusnih okužbah (Linkermann in Green, 2014; Vandenabeele in sod., 2010).



Slika 6: Signalizacija pri nekroptozii. Ključen je nastanek kompleksa IIc, kjer pride do aktivacije RIP1 in RIP3 ter posledično do fosforilacije MLKL. Povzeto po (Vanden Berghe in sod., 2014).

1.1.3 Nekroza

Nekroza je od nekdaj veljala za patološko celično smrt, ki poteče v primeru poškodb, hipoksije, v prisotnosti toksinov ali ko primanjkuje ATP. Celica se pri tem napihne, kar privede do pokanja membran organelov ter plazemske membrane in izlitja celične vsebine. V nasprotju z apoptozo pri nekrozi ne pride do kondenzacije kromatina. Ena glavnih posledic je sproščanje proinflammatoryh citokinov in drugih molekul, ki sprožijo imunski odziv.

Pomembna oblika celične smrti je tudi sekundarna nekroza, ki poteče v apoptotskih celicah oz. apoptotskih telescih, ko le-ta niso odstranjena s fagocitozo. To vodi v nabrekanje nastalih telesc, porušnje membran in aktivacijo hidrolaz, kar privede do lize (Bortner in Cidlowski, 2014; Edinger in Thompson, 2004; Galluzzi in sod., 2018; Nikolettou in sod., 2013).

1.2 Avtofagija

Celica ohranja homeostazo z recikliranjem proteinov in celičnih organelov preko dveh med seboj povezanih sistemov – ubikvitin proteasomalnega sistema (angl. ubiquitin proteasomal system, UPS) in avtofagije oz. avtofagične lizosomske poti (Kimmelman, 2011; Mizushima, 2007; Xilouri in Stefanis, 2016). UPS, ki je ključen pri razgradnji kratkoživečih ter nenormalnih proteinov, se nahaja primarno v citoplazmi, najdemo ga pa lahko tudi v jedru ali pa vezanega na membrane (Ciechanover, 2012; Lamark in Johansen, 2010; Scharf in sod., 2007). UPS omogoča

kontrola različnih celičnih funkcij, kot so: popravljanje DNA, prepisovanje genov, celični cikel, prenos signalov, imunski odziv, metabolizem, nadzor kakovosti proteinov in apoptozo. Spremembe v delovanju UPS lahko privedejo do razvoja različnih bolezenskih stanj (nevrodegenerativna obolenja, rak in različne okužbe) (Galluzzi, Bravo-San Pedro, in sod., 2017; Wong in Cuervo, 2010).

Avtofagija in UPS sta med seboj povezana preko izbire in označevanja substrata, prepoznavanja le-tega, njegove razgradnje in na koncu recikliranja nastalih aminokislin (Park in Cuervo, 2013). Pri sesalcih je ključna povezava med avtofagijo in UPS ubikvitinacija, kjer so poliubikvitinske verige, vezane na lizin na 48. ali 11. poziciji (K48/K11), potrebne za razgradnjo preko UPS. Poliubikvitinske verige, vezane na lizin na 63. poziciji (K63), pa so najverjetneje signal za lizosomsko razgradnjo (P. K. Kim in sod., 2008; Wong in Cuervo, 2010). Povezavo med sistemoma so potrdili tudi Ding in sodelavci, ko so z inhibicijo proteasoma sprožili avtofagijo kot kompenzacijski proces. Če pa istočasno zaustavimo še avtofagijo, se začnejo kopičiti kratkoživi substrati, značilni za UPS (Ding in sod., 2007).

Beseda avtofagija izhaja iz grških besed *auto*, kar pomeni samega sebe, in *phagy*, kar pomeni jesti (Kimmelman, 2011; Levine in Kroemer, 2008). Prvič jo je kot katabolni proces opisal de Duve leta 1963 (De Duve, 1963; De Duve in Wattiaux, 1966). Ključne vloge avtofagije so pridobivanje energije tekom stradanja, preprečevanje kopičenja škodljivih produktov med izpostavitvijo različnim stresnim dejavnikom, odstranjevanje poškodovanih oziroma iztrošenih organelov, sodelovanje pri predstavitvi antigenov itd. Veliko znanstvenih razprav je tudi na temo o avtofagični celični smrti (Klionsky in Emr, 2000; Mizushima in Komatsu, 2011; White, 2008).

Glede na fiziološko aktivnost in način dostave materiala za razgradnjo ločimo tri poti: makroavtofagijo, mikroavtofagijo in avtofagijo, odvisno od šaperonov (angl. chaperone-mediated autophagy, CMA) (Levine in Kroemer, 2008). CMA poteka samo v sesalskih celicah in v nasprotju z ostalima oblikama avtofagije pri CMA ni potrebna tvorba veziklov. Potek je sestavljen iz štirih ključnih korakov. Substrati za razgradnjo preko CMA so označeni z zaporedjem KFERQ (lizin-fenilalanin-glutaminska kislina-arginin-glutamin). Pentapeptidno zaporedje prepozna šaperon Hsc70, ki ga dostavi do lizosomskega receptorja LAMP-2A, ki ob tem tvori trimerni kompleks. Tam se substrat razvije in prenese v lumen lizosoma, kjer se razgradi. Pri tem sodelujeta še lizosomska Hsc70 in Hsp90. Hsc70 in LAMP-2A se po uporabi reciklirata. CMA je potrebna za »preverjanje kakovosti proteinov«, pri tem pa se razgradijo zgolj neustrezni proteini brez vpliva na ostale bližnje proteine. Tako se razgrajujejo nekateri encimi, transkripcijski dejavniki in vzdrževalni proteini (npr. transkripcijski dejavnik HIF-1 α , ubikvitinska ligaza STUB1/CHIP), zato ima tudi pomembno vlogo pri regulaciji celičnih procesov. CMA poteka ves čas v celici, pospešeno pa se aktivira v stresnih pogojih, kot so oksidativni stres, izpostavitve toksinom in stradanje. Takrat se poveča prepisovanje LAMP-2A in zmanjša njegova razgradnja s katepsinom A, povišana je tudi vrednost lizosomskega Hsc70 (Arias in Cuervo, 2011; Cuervo, 2004a, 2004b; Mizushima, 2007; Xilouri in Stefanis, 2016).

Za mikroavtofagijo je značilno uvijanje lizosomske membrane, pri katerem sodelujejo GTPaze (npr. Vps1p) in je potreben intakten membranski potencial. Začetek nastajanja kislih telesc regulirajo kompleksi proteinov Atg, kot so: Atg7, Atg8, Atg4, Atg10, Atg12, Atg5 itd. Nastala kislila telesa imajo navadno okroglo ali tubularno obliko. Najprej se razgradi membrana telesa in nato še njihova vsebina. Neselektivno mikroavtofagijo običajno sprožita pri sesalcih stradanje in pomanjkanje dušika, sicer pa ima mikroavtofagija pomembno vlogo pri lipidnem metabolizmu, sodeluje pri vzdrževanju velikosti organelov in membranski sestavi. Poznane pa so tudi selektivne oblike mikroavtofagije, ki so predvsem zaznane pri kvasovkah. Dobro opisane so: mikropeksosofagija za odstranjevanje nepravilno delujočih peroksisomov, mikroavtofagija jedra, s katero se odstrani nepotreben del jedra, in mikromitofagija, s katero se razgradijo poškodovani mitohondriji (Cuervo, 2004a, 2004b; Klionsky in Emr, 2000; W. W. Li in sod., 2012).

1.2.1 Makroavtofagija

Makroavtofagija (v nadaljevanju samo avtofagija) je prisotna v vseh evkariontskih celicah, ki imajo jedro, in je evolucijsko izredno ohranjen proces (velika podobnost med geni *atg* kvasovk, rastlin in živali) (Galluzzi, Baehrecke, in sod., 2017; Klionsky in Emr, 2000). Poznamo neselektivno avtofagijo, ki poteka na bazalni ravni ali tekom stradanja, in selektivno avtofagijo, kot so Cvt pot, peksosofagija, mitofagija, lizofagija, retikulofagija, lipofagija, ksenofagija itd., ko so v razgradnjo substrata vključeni specifični proteini za prepoznavanje velikosti in oblike substrata (Galluzzi, Baehrecke, in sod., 2017; Mancias in Kimmelman, 2016).

Avtofagija v zdravih celicah ves čas poteka na bazalni ravni, da se ohranja znotrajcelično ravnovesje, v nenormalnih, stresnih razmerah pa se raven avtofagije poviša (Levine in Kroemer, 2008). Najpogostejši sprožilci so pomanjkanje hranil, neravnovesje v razmerju AMP/ATP, anti-

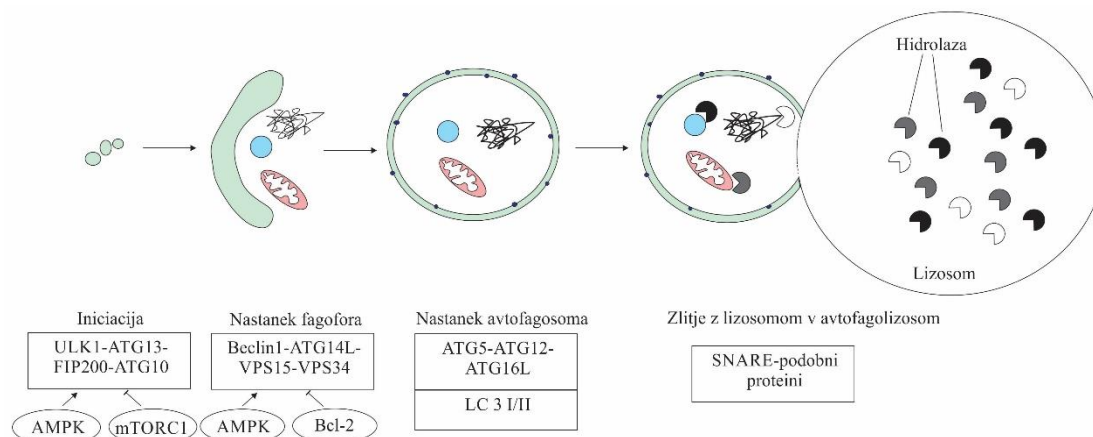
rakava terapija, ROS, kopičenje neustrezno zviti proteinov ter drugo. Na avtofagijo pa vplivajo tudi hormoni, rastni dejavniki in regulatorni proteini, kot so mTOR, Beclin1, UVRAG, AMBRA, Rubicon, Bcl-2, AMPK, DRAM, TRAIL, FADD, itd. (Kaur in Debnath, 2015; Kimmelman, 2011).

V sam proces je vključenih več kot 37 avtofagnih proteinov, ki so evolucijsko ohranjeni in zato ostaja podoben mehanizem tako pri kvasovkah kot pri rastlinah in živalih. Potek avtofagije je razdeljen na pet stopenj (slika 7): iniciacijo, nukleacijo, nastanek avtofagosoma, zorenje in razgradnjo (Kimmelman, 2011; Ohsumi, 2014). Komponente, namenjene razgradnji, začne obdajati membrana, ki se tvori na mestu nastanka fagofora (angl. phagophore assembly site; PAS). Membrana naj bi izvirala iz endoplazemskega retikuluma, Golgijevega aparata, mitohondrijev ali pa plazmaleme, vendar je njen točen izvor še vedno neznan. Ta začetni proces regulira kompleks ULK (UNC51 podobna kinaza, angl. UNC51-like kinase), sestavljen iz ULK1, avtofagnega proteina 13 (angl. autophagy related protein 13, Atg13), FIP200 (FAK family kinase interacting protein of 200 kDa) in Atg101. Delovanje kompleksa regulirata kompleks sesalske tarče rapamicina 1 (angl. mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) in AMP-aktivirana proteinska kinaza (angl. AMP-activated protein kinase, AMPK) (Das in sod., 2012; Kaur in Debnath, 2015; Lamb in sod., 2013). V normalnih pogojih mTORC1 fosforilira kinazo ULK1 in hiperfosforilira Atg13, kar inhibira avtofagijo. V stresnih pogojih, npr. pri stradanju, je mTORC1 inhibiran in se ne more vezati na kompleks ULK. Posledično lahko ULK1 fosforilira Atg13 in FIP200 ter avtofagija poteče. V nasprotju z mTORC1 pa AMPK spodbudi nastanek iniciacijskega kompleksa ULK, ko v celici primanjkuje ATP in se pričeta kopičiti ADP ter AMP (Chen in Klionsky, 2011; Russell in sod., 2014).

Aktiven kompleks ULK sproži tvorbo kompleksa Beclin1, ki regulira nastanek fagofora in podaljševanje avtofagosomske membrane (slika 7). ULK1 fosforilira Ambra1, ki nato interagira s TRAF6 (E3 ubikvitin ligaza). Zaradi ubikvitinacije postane kompleks ULK še bolj stabilen. ULK1 poleg tega fosforilira Beclin1 in spodbudi njegovo vezavo v kompleks z Atg14L, VPS15 in VPS34. Ta kompleks je potreben za nastanek fosfo-inozitol-3 fosfatnih (angl. phospho-inositol-3 phosphate, PI3P) lipidov, ki sodeluje pri nukleaciji, in je vključen v znotrajcelično premikanje veziklov (Das in sod., 2012; K. H. Kim in Lee, 2014). Beclin1 ima številne vezavne partnerje. Ambra1, UVRAG in Bif1 sprožijo avtofagijo, medtem ko vezava anti-apoptotskih proteinov Bcl-2 ali Bcl-X_L na Beclin1 avtofagijo zavira (Ravikumar in sod., 2010).

Pri končnem nastanku avtofagosoma pa sodelujeta dva ubikvitinu podobna konjugacijska sistema (slika 7). Atg4 je cisteinska proteaza, ki s cepitvijo pretvori pro-LC3 v zrelo obliko LC3. Nanj se v prisotnosti Atg7 in Atg3 veže fosfatidiletanolamina (angl. phosphatidylethanolamine, PE). Vezava PE na LC3 je reverzibilen proces, saj Atg4 odcepi PE, LC3 pa se ponovno uporabi v reakciji. Atg12 se najprej veže na Atg5 ob prisotnosti Atg7 (E1 podoben ubikvitin aktivacijski encim) in Atg10 (E2 podoben ubikvitin vezavni encim). Konjugat Atg12-Atg5 skupaj z Atg16L tvori tetramerni kompleks Atg12-Atg5-Atg16L, ki se veže na membrano nastajajočega avtofagosoma in poskrbi za vezavo PE na LC3. LC3-PE, ki se nahaja na membrani avtofagosoma, nato ključno prispeva k nastanku in podaljševanju avtofagosoma (Das in sod., 2012; K. H. Kim in Lee, 2014; Yang in Klionsky, 2009). Za izgradnjo avtofagosoma sta potrebna tudi Atg9 in VMP1 (angl. vacuole membrane protein 1). Atg9 je lociran na trans-Golgijevem aparatu ter poznih endosomih in se v stresnih pogojih s pomočjo aktinskega citoskeleta in nekaterih Atg proteinov (Atg23, Atg27) prenese v periferne predele celice. VMP1, ki je vezan na plazemsko membrano, najverjetneje poveže Beclin1 in ostale komponente v fagoforju (Lamb in sod., 2013; Ravikumar in sod., 2010; Yang in Klionsky, 2010).

V transport avtofagosomov po celici je vključen citoskelet (zlasti mikrotubuli) in motorni proteini (npr. kinezini in dineini). Pri zlitju avtofagosoma z lizosomi pa sodelujejo številni SNARE podobni proteini. Do sedaj so kot regulatorne molekule bile potrjene nekatere GTPaze (Rab7, Rab11), SNARE (angl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), ESCRT (angl. endosomal sorting complexes required for transport) in drugi proteini, vendar njihovo delovanje še ni bilo podrobno pojasnjeno (Kato in sod., 2018; Reggiori in Ungermann, 2017). Pri zlitju se zunanja membrana avtofagosoma združi z lizosomsko membrano; notranji membranski vezikel avtofagosoma pa se sprosti v lumen lizosoma. Vsebina avtofagosoma se nato razgradi s hidrolazami, med katerimi ima pomembno vlogo tudi Atg15, ki je lipaza. Posamezne komponente (npr. aminokisline) so po razgradnji prenešene nazaj v citosol, kjer se ponovno uporabijo za izgradnjo. Pri tem sodelujejo Atg22 (pri kvasovkah) in LYAAT1/2 (angl. lysosomal amino acid transporter 1/2), ki so potrebni za transport aminokislin. Kljub vsemu pa še ni znano, kako je z recikliranjem ostalih makromolekul, kot so lipidi in ogljikovi hidrati (Yang in Klionsky, 2009).



Slika 7: Shema signalne poti pri makroavtofagiji. Slika prirejena po (Kaur in Debnath, 2015).

1.2.2 Avtofagična celična smrt

Avtofagija največkrat deluje kot preživetveni mehanizem, ki se vključi ob izpostavitvi različnim stresnim dejavnikom. Kljub vsemu pa je povezana tudi s celično smrtjo. Sprva so jo opisali kot neapoptotsko programirano celično smrt tipa II oz. avtofagično celično smrt na modelu rakavih celic mlečnih žlez in žlezah slinavkah med razvojem bube pri *D. melanogaster*. Morfološko se kaže kot prisotnost številnih avtofagičnih vakuol v citoplazmi, odsotnost kondenzacije kromatina, povečanje nekaterih organelov ali pa njihovo izginotje, vendar natančen mehanizem še ni popolnoma pojasnjen (Das in sod., 2012; Eskelinen in Saftig, 2009; Levine in Kroemer, 2008).

Avtofagija je lahko prisotna pred ali med samo celično smrtjo, lahko pa spodbudi celično smrt s povišano ravnjoproteolize ali razgradnjo ključnih preživetvenih molekul. Vendar to verjetno ni ključni dejavnik celične smrti, ampak samo mehanizem, s katerim se celica očisti ali pa pridobi zadostno raven energije, da izvrši celično smrt. Avtofagija je tako samo »partner« v celični smrti, zato je vedno bolj uveljavljen izraz smrt z avtofagijo. Avtofagija naj bi tako imela pomembno vlogo v ferroptizi (feritinofagija), apoptozi, sproženi s FasL, in nekroptozi (Denton in sod., 2012; Galluzzi in sod., 2018; Levine in Kroemer, 2008; White, 2008).

Liu in sodelavci pa so 2013 opisali avtozo (angl. autosis: auto – avtofagična, tosis – smrt), ki se sproži med dolgotrajnim stradanjem ali pa stimulacijo avtofagije (Galluzzi in sod., 2018; Liu in sod., 2013). Morfološke značilnosti so: naluknjane plazemske membrane, krčenje in točkovno uvijanje jedrne membrane, napihovanje medmembranskega prostora jedra, delno zaznavna kondenzacija kromatina, prisotnost številnih avtofagosomov in avtolizosomov, ki v zadnji stopnji izginejo, nenormalni in napihnjeni mitohondriji, fragmentacija in postopno izginjanje ER ter povečana vezava. Avtozo lahko zavremo z genetsko ali farmakološko inhibicijo Na^+ , K^+ -ATPaze, ki je membransko vezana črpalka. Inhibicija kaspaz, kinaz RIP ali izbitje genov za Bax/Bak pa nanjo ne vplivajo, prav tako ROS nimajo pomembne vloge. Trenutno je (pato)fiziološka vloga avtoze še neznan, vendar je mogoče vključena pri ishemičnih poškodbah organov in nekaterih nevrodegenerativnih obolenjih (Liu in sod., 2013).

1.3 Oksidativni stres

Z vzpostavitev okolja, bogatega s kisikom, so se razvile aerobne metabolne poti. Ena izmed posledic pa je bil tudi oksidativni stres, ki je definiran kot povišana koncentracija reaktivnih kisikovih vrst (ROS), ki negativno vplivajo na vitalni metabolizem ter njegovo regulacijo, in povzroči različne poškodbe. Oksidativni stres običajno nastane kot posledica povišane ravni endogenih ali pa eksogenih spojin, ki spodbudijo nastanek ROS, pomanjkanja antioksidantov z nizko molekulsko maso, inaktivacije ali pa zmanjšane sinteza encimskih antioksidantov (Fischer in sod., 2016; Lushchak, 2014; Sies in Cadenas, 1985).

ROS so precej neobstoje molekule kisika, ki imajo običajno neparno število elektronov ali pa nestabilne vezi (slika 8). Med najbolj razširjene prištevamo superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal ($\text{OH}^\cdot$) in vodikov peroksid (H_2O_2). Superoksidni anion in vodikov peroksid sta najbolj pogosti in tudi najbolj proučeni signalni molekuli (Lushchak, 2014). Vsem ROS pa je skupno, da lahko molekulam odvzamejo elektron in s tem sprožijo verižno reakcijo, ki povzroči celične poškodbe (Filomeni in sod., 2015).

Mitochondriji so poleg peroksisomov, endoplazemskega retikuluma in endo-lizosomskega sistema glavni vir ROS v celici (Navarro-Yepes in sod., 2014). ROS, ki nastanejo na kompleksu I in III v elektronski transportni verigi (ETC), se po nastanku sprostijo v medmembranski prostor in deloma v mitohondrijski matriks. Večji del superoksidnih molekul, ki zaradi negativnega naboja ne morejo prehajati membran, se s superoksid dismutazo (SOD) pretvori v vodikov peroksid. Vodikov peroksid je veliko bolj obstojen kot superoksidni anion in lahko prehaja membrane z difuzijo ali pa preko specifičnih vodnih kanalčkov – peroksiaporinov (Filomeni in sod., 2015; Lushchak, 2014). Vodikov peroksid se nato lahko vključi v Fentonovo reakcijo skupaj s Fe^{2+} ter pri tem tvori vodikov radikal ali pa se pretvori v vodo s peroksiredoksini, katalazami ali peroksidazami (Valko in sod., 2016).

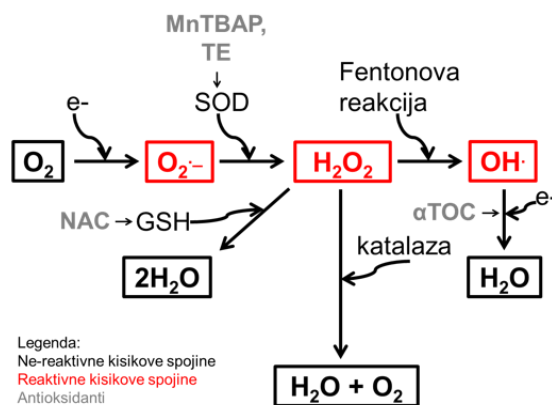
Peroksisomi so organeli, v katerih poteka lipidni metabolizem, katabolizem aminokislin, poliaminska oksidacija itd. Vsebujejo veliko encimov, ki proizvajajo ROS in RNS kot stranski produkt. Ključna encima sta ksantin oksidaza in dušikov oksid sintaza. Da ne pride do uhajanja vodikovega peroksida pa poskrbi katalaza, ki ga pretvori v kisik. Poleg peroksisomov naj bi bil pomemben vir ROS tudi endoplazemski retikulum, kjer naj bi bili potrebni za pravilno izoblikovanje disulfidnih mostičkov med zvijanjem in izločanjem proteinov (Brand, 2010; Fransen in sod., 2012).

Zelo pomemben vir predstavljajo tudi encimi, kot so:

- oksidaze NADPH (NOX) – ROS nastanejo kot njihov glavni produkt, ko se prenese elektron s citosolnega NADPH na kisik ter pri tem nastane superoksid;
- ksantin oksigenaze – glavni vir ROS v hipoksičnih pogojih;
- ciklooksigenaze (COX),
- lipooksigenaze (LOX) itd.

Kljub vsemu pa se lahko razmerje v produkciji ROS razlikuje med posameznimi tipi celic in fiziološkim stanjem celic (Brand, 2010; Gao in Schottker, 2017; Kaludercic in sod., 2014; Lushchak, 2014; Sies, 2017).

ROS običajno služijo kot signalne molekule v različnih bioloških procesih, kot so celična diferenciacija, proliferacija, transkripcija, vnetni procesi in pridobljena (adaptivna) imunost. Povišanje mitohondrijskih ROS pa po drugi strani povezujemo z nekaterimi patološkimi stanji, kot so različne oblike rakavih obolenj, saj naj bi povzročili poškodbe DNA, proteinov ter lipidov in s tem pripomogli h genetski nestabilnosti in tumorigenezi. Nekateri študije nakazujejo tudi povezavo med oksidativnim stresom in celično smrtjo v primeru srčne, ledvične ali jetrne ishemije (Daiber, 2010; Fransen in sod., 2012; Sies, 2017).



Slika 8: Poenostavljen prikaz nastajanja ROS v mitochondrijih in kje naj bi NAC, MnTBAP, TE in α TOC kot antioksidanti delovali.

1.3.1 Antioksidanti

Živi organizmi so za vzdrževanje homeostaze razvili mehanizme, s katerimi lahko omejijo oksidativni stres.

Pri zaznavanju oksidativnega stresa so ti mehanizmi zelo pomembna celična stikala, ki se vključijo glede na raven oksidativnega stresa. V primeru nizkega in kratkotrajnega stresa se aktivira Nrf2/Keap1 (angl. nuclear derived (erythroid-derived 2)-like 2 transcription factor in Kelch-like ECH-associated protein 1) signalna pot. V nestresnih pogojih se Keap1 in Nrf2 povežeta, Nrf2 pa se ubikvitinira in posledično razgradi v proteasomu. Ko pride do povišanja ROS, pa se tiolna skupina Nrf2 proteina oksidira in vezava ni več mogoča. Nrf2 se transportira v

jedro, kjer sproži prepisovanje genov za encimske antioksidante ali pa encime, ključne za sintezo antioksidantov. Če pride do nekoliko povečane stopnje oksidativnega stresa, se vključijo trije regulatorni sistemi: NF- κ B, AP1 (angl. animal homologue of yeast YAP1) in kinaze MAP. Vsi omenjeni sistemi vplivajo na povečanje izražanja genov za encimske antioksidante, poleg tega pa še na molekule, ki so vključene v druge celične mehanizme in vnetje. V kolikor je koncentracija ROS previsoka, se vključijo alternativni obrambni mehanizmi. Prej omenjeni transkripcijski dejavniki imajo v DNA-vezavnem mestu cistein. Če je cistein oksidiran, se transkripcijski dejavniki ne morejo vezati na DNA v jedru. Na mitohondrijski membrani pa se tvorijo pore, kar lahko na koncu privede celo do celične smrti (Gao in Schottker, 2017; Lushchak, 2014).

Antioksidante delimo na encimske in ne-encimske. Med encimske antioksidante uvrščamo SOD, superoksid reduktazo, katalazo, glutation (GSH) peroksidazo, GSH reduktazo, peroksiredoksin in tioredoksin. SOD imajo v aktivnem centru kovinski ion, ki reagira s superoksidom. Ker je SOD razmeroma velik protein, ne more prosto prehajati v celice in jo organizem v primeru dodajanja izloči. Da bi se temu izognili, so nanjo vezali PEG (angl. polyethylene glycol). Tak konstrukt ni bil imunogen, poleg tega pa so ga celice prevzele s piknozo. Podobno so naredili tudi s katalazo. Poskusili so tudi z drugimi modifikacijami SOD: vključitev v liposome, vezava na protitelesa anti-PECAM in anti-iCAM, vendar to nikoli ni bilo uporabljeno v kliničnih študijah (Bourassa MG, 2006; V. O. Kaminsky in Zhivotovsky, 2014; Sies, 2017).

Trenutno še ni znan noben encim, ki bi lahko odstranil OH $\cdot$, zato je za organizme najbolje, da preprečijo nastanek samega radikala. Če pa nastane v manjši meri, ga lahko nevtralizirajo antioksidanti z nizko molekularno maso (npr. vitamin E ali α tokoferol) (Lushchak, 2014).

Med ne-encimske antioksidante prištevamo GSH, flavonoide, vitamine A, C in E (Bourassa MG, 2006). Številni eksogeni antioksidanti se uporabljajo kot zdravilne učinkovine ali pa so v fazi testiranja.

N-acetil cistein (NAC) (slika 8) ima zelo nizek antioksidativni potencial, vendar deluje kot eksogeni prekurzor za glutation (GSH). NAC donira cistein, ki se uporabi pri *de novo* sintezi GSH. Trenutno še ni popolnoma pojasnjeno, ali lahko NAC prosto prehaja celične membrane ali se prvotno deacitlira in nastali cistein vstopi v celice preko aminokislinskega transporterja. GSH deluje kot intracelularni antioksidant, ki preprečuje peroksidacijo z interagiranjem z glutation peroksidazo ali pa neposredno z oksidacijo tiolnega radikala, preko katerega se nato tvorijo glutationski disulfidi. GSH ima poleg tega še tiolno/tiolno aktivnost, saj interagira z dušikovim oksidom ($\cdot$ NO) in dioksidom ($\cdot$ NO $_2$), deloma lahko razgradi tudi superoksid. GSH naj bi prispeval tudi k obnovi nekaterih drugih antioksidantov, kot je vitamin C, in posredno vitamina E (Bourassa MG, 2006; Rushworth in Megson, 2014). Zaradi svojih pozitivnih učinkov se NAC pogosto uporablja in glede na podatke je vključen v več kot 100 kliničnih študij (spletna stran: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NAC&Search=Apply&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age=v=&gndr=&type=&rslt=>, 16. 11. 2017). Učinkovit naj bi bil pri cistični fibrozi in drugih dihalnih obolenjih, kjer naj bi razgrajeval sluz, deloma pa naj bi vplival tudi na produkcijo ROS v nevtrofilcih, ki so povezani s poškodbami pljučnega tkiva ter fibrozo. Uporablja pa se ga tudi pri predoziranju z različnimi farmacevtskimi učinkovinami (npr. acetaminofen/paracetamol) ali zastrupitvami z organofosfati. Veliko študij je bilo narejenih v povezavi z diabetesom, nevrofiziatričnimi obolenji in celo okužbami z virusom HIV, vendar so bili izsledki nekoherentni. Predvidoma naj bi bilo to posledica tega, da je NAC učinkovit samo v primeru, ko je bolezensko stanje povezano s pomanjkanjem GSH (Bavarsad Shahripour in sod., 2014; Elbini Dhouib in sod., 2016; Rushworth in Megson, 2014).

Številna obolenja, kot so ateroskleroza, avtoimunska obolenja in nevrološke motnje, so povezana z lipidno peroksidacijo. Poznamo α , β , γ in δ tokoferole, ki so lipidotopne molekule in se med seboj razlikujejo po stranski verigi. Tokoferoli (slika 8) lahko lipide zaščitijo tako, da se skoncentrirajo na lipidnem dvosloju in prekinajo peroksidacijo z doniranjem vodika iz hidroksilne skupine. Pri tem nastane razmeroma nereaktiven tokoferoksilni radikal, ki se nato v prisotnosti vitamina C ali tiolov pretvori nazaj v tokoferol. V kolikor se radikal kopiči, lahko sam prispeva k povišanju lipidne peroksidacije (Bourassa MG, 2006; Traber in Stevens, 2011). α tokoferol je bil vključen v različne klinične študije, v katerih pa niso uspeli potrditi, da bi preprečeval nastanek raka mlečnih žlez, da bi zmanjšal pojavnost periferne nevropatije po kemoterapiji ali pa da bi zmanjšal tveganje za razvoj raka prostate. Kljub vsemu pa so v nedavno objavljenih izsledkih raziskave povzeli, da lahko dolgoletna uporaba α tokoferola koristno vpliva na napredovanje raka prostate (Bakker in sod., 2016; Kottschade in sod., 2011; Sato in sod., 2002).

Obstajajo številne majhne molekule, ki imajo aktivnost podobno SOD – SOD mimetiki. V porfirinski obroč imajo vključen kovinski ion, največkrat mangan, ki naj bi bil potreben za njihove antioksidativne lastnosti (slika 8). V naši raziskavi smo uporabili Tempol/TE (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil) in MnTBAP (n(III)tetrakis(4-benzoična kislina)porfirin klorid).

MnTBAP ima nizek naboj, zato lahko brez težav prehaja celično membrano in pride tudi v mitohondrije. Mangan, ki je sestavni del molekule, je ključen za njegovo delovanje. Poleg običajnih superoksidnih anionov lahko v reakcijo vstopijo še ONOO-, ClO- in CO₃-, saj so odlični prejemniki elektronov. MnTBAP naj bi izboljšal stanje po hipoksični poškodbi možganov, preprečil poškodbe pljuč po izpostavitvi sevanju in zmanjšal stranske učinke pri kemoterapiji. Vplival naj bi tudi na znižanje tlaka, vendar naj bi to bilo posledica sproščanja histamina. Tekom študij so opazili, da ima tudi pro-oksidativne lastnosti. Doslej še ni bil uporabljen v kliničnih študijah na ljudeh (Bourassa MG, 2006; Salvemini in sod., 2002). Tempol je nitroksid, ki lahko ciklično vstopa v oksido-redukcijsko reakcijo. Kot SOD mimetik lahko nevtralizira nastale superoksidne anione, preprečuje pa tudi nastanek hidroksilnih radikalov s katalazno aktivnostjo. Tempol oksidira železove ione in tako prepreči njihovo reakcijo s peroksidi, posledično pa peroksidacijo celičnih komponent (npr. lipidov, DNA in proteinov) (Bourassa MG, 2006; Wilcox, 2010). Ker lahko prosto prehaja celične membrane, gastrointestinalni trakt in možgansko opno, je vzbudil zanimanje kot potencialno zdravilo za kardiovaskularna in nevrodegenerativna obolenja ter druge motnje. Tempol je bil uporabljen tudi kot glavna komponenta gela, ki so ga uporabljali za preprečevanje alopecije kot posledice radioterapije. Predklinične študije so pokazale, da naj bi zniževal krvni tlak, vplival na vazodilatacijo in zmanjšal posledice kapi. V raziskavi, objavljeni leta 2014, naj bi preprečeval nefrotoksičnost, povzročeno s cisplatinom, saj naj bi inhibiral ROS, zaščutil komplekse v elektronski transportni verigi in preprečil apoptozo. Poleg tega naj bi bil edini izmed številnih testiranih antioksidantov, ki naj bi zavrl oksidativni stres, ki domnevno prispeva k patogenezi cerebralne malarije. Kljub vsemu pa so učinki Tempola pod vprašajem, saj naj bi bil njegov vpliv na znižanje tlaka posledica sproščanja kateholamina in ne antioksidativnega delovanja. Poleg tega lahko deluje kot oksidant, saj v reakciji s superoksidom nastane oksamonijev kation, ki lahko oksidira tiole ter lipidne molekule in naj bi vplival na delovanje mitohondrijev, vendar te domneve še niso potrjene (Ahmed in sod., 2014; Soule in sod., 2007; Wilcox, 2010).

Kljub številnim pozitivnim učinkom antioksidantov v *in vitro* študijah, v kliničnih študijah uporaba antioksidantov ni prinesla pričakovanih rezultatov. Razlog za to bi lahko bil, da je dodajanje antioksidantov prepozno, njihova koncentracija neustrezna ali pa da so premalo specifični. Poleg tega so lahko visoke koncentracije antioksidantov toksične, saj lahko vplivajo na povečanje ROS in RNS ter na celične signalne poti, povezane z vnetnimi procesi (NF- κ B in MAPK itd.). Najbolje doslej se je izkazal NAC, ki pa ni običajen antioksidant, saj obnovi celične zaloge GSH in pripomore k delovanju encimskega sistema. Proučuje se tudi možnost uporabe inhibitorjev encimov, ki proizvajajo ROS. Tak primer so NOX inhibitorji, vendar so bili pri začetnih poskusih neuspešni, saj so preveč toksični in izredno nespecifični (Bouayed in Bohn, 2010; Brieger in sod., 2012). Kaludercic in sodelavci so predlagali, da bi glede na pomembnost ROS v fizioloških in patofizioloških procesih bilo boljše, če bi inhibirali specifične procese, v katerih ROS nastajajo, in ne uporabljali splošnih antioksidantov. Poleg tega še vedno ostaja vprašanje, ali imajo ROS ključno vlogo pri nekaterih obolenjih ali so zgolj stranski produkt (Kaludercic in sod., 2014).

1.4 Lizosomi in lizosomska celična smrt

1.4.1 Lizosomi

Lizosom sta prvič opisala Appelmans in de Duve leta 1955 (Appelmans, 1955). Običajno so ti znotrajcelični organeli sferične ali tubularne oblike. Na njihovo obliko, številčnost in porazdelitev vplivajo vrsta celice in stopnja celične presnove (H. Xu in Ren, 2015). lizosomska membrana primarno služi kot fizična pregrada med kislim lumnom lizosomov in citosolom. Vanjo so vgrajeni številni proteini, ki delujejo kot transporterji, receptorji in encimi. Lizosomski membranski proteini (angl. lysosomal-associated membrane protein, LAMP) so pred razgradnjo zaščiteni z glikokaliksom, membrane pa so stabilizirane s proteini toplotnega šoka oz. stresnimi proteini (angl. heat shock protein, Hsp), velikosti 70 kDa, in holesterolom (Mrschik in Ryan, 2015; Repnik in sod., 2012; Saftig in sod., 2010).

Lizosomi so velikokrat končna postaja znotrajceličnega transporta, zlasti endocitoze, fagocitoze in autofagije. Potek endocitoze je sestavljen iz več korakov: najprej pride do zaprtja substrata v zgodnji endosom, ki dozori v pozni endosom. Slednji se zlije z lizosomom in posledično pride do razgradnje substrata. Tekom endocitotske poti vrednost pH pada (v zgodnjih lizosomih je pH med 6,8 in 6,1; v poznih endosomih je med 6,0 in 4,8; v lizosomih pa je 4,5). Hidrolaze, ki pa so ključne za razgradnjo materiala, so prisotne v poznem endosomu in v lizosomu

(Appelqvist in sod., 2013; Huotari in Helenius, 2011; Kurz in sod., 2011; Merschlik in Ryan, 2015).

Kljub vsemu lizosomi nimajo zgolj katabolne funkcije, ampak so povezani tudi z drugimi procesi, vključno s celično smrtjo, aktivacijo inflammasoma in imunskim odzivom, vzdrževanjem ravnovesja železa v celici ter z lizosomskim izločanjem in recikliranjem holesterola. Zaradi njihove vpletenosti v številne procese ni presenetljivo, da so povezani tudi z razvojem nekaterih človeških bolezni, kot so rak, nevrodegenerativne motnje, bolezni srca in ožilja, številnimi vnetnimi obolenji in motnjami lizosomske presnove (angl. lysosomal storage disease) (Appelqvist in sod., 2013; Bogdan in sod., 2016; Eskelinen in Saftig, 2009; Hu in sod., 2015; Parenti in sod., 2015; Settembre in sod., 2013; Stoka in sod., 2016).

1.4.1.1 Katepsini

Lizosomske hidrolaze vključujejo proteaze, nukleaze, lipaze, fosfataze, sulfataze in glikozidaze (Hafner Cesen in sod., 2016). Njihova vloga je razgradnja materiala na osnovne enote, ki nato z difuzijo ali aktivnim transportom preidejo v citosol in se ponovno uporabijo (Merschlik in Ryan, 2015; H. Xu in Ren, 2015).

Med lizosomskimi proteazami so najbolj opisani katepsini, ki se delijo na cisteinske, aspartatne (katepsin D in E) in serinske (katepsin A in G) proteaze. Aspartatni proteazi, katepsina D in E, sta prisotni v poznih endosomih, medtem ko je v nevtralnem pH aktiven katepsin G prisoten le v azurofilnih granulah (z lizosomom povezani organeli) in posledično ni prava lizosomska proteaza. Poznanih je 11 človeških cisteinskih katepsinov: B, C, F, H, L, K, O, S, V, W in X. Večina cisteinskih katepsinov je prisotnih v vseh tipih celic in so povezani s splošno lizosomsko razgradnjo proteinov. Nekateri pa se izražajo le v določenih tkivih, kjer imajo bolj specifično funkcijo; npr. katepsin K v osteoklastih, katepsin S v antigen-predstavitvenih celicah in katepsin W v limfocitih ter naravnih celicah ubijalkah. V največji meri so izraženi katepsini B, L in S, ki so zato povezani s številnimi fiziološkimi in patološkimi procesi (Kramer in sod., 2017; Reiser in sod., 2010; V. Turk in sod., 2012). Katepsin B ima pomembno vlogo pri procesiranju hormonov in razgradnji zunajceličnega matriksa; katepsin L je odgovoren za endolizosomsko razgradnjo proteinov, spermatogenezo in predstavitev antigenov; katepsin S pa je vključen v predstavitev antigenov in procesiranje invariantne verige kompleksa MHC II (Fonovic in Turk, 2014; V. Turk in sod., 2012).

Katepsini nimajo specifičnih substratov, kot jih imajo npr. kaspaze. V *in vitro* poskusih v celicah so dokazali, da lahko katepsini cepijo Bid v tBid, antiapoptotske proteine iz Bcl-2 družine in celo inhibitor apoptoze XIAP (Droga-Mazovec in sod., 2008; B. Turk in sod., 2012). V glavnem so endopeptidaze, katepsina C in X sta eksopeptidazi, katepsina B in H pa sta oboje. Kislo pH v lizosomih je potreben za razvitje proteinskih substratov in je optimalen za encimsko aktivnost cisteinskih in aspartatnih katepsinov. Večina, z izjemo katepsina S (Vasiljeva in sod., 2005), jih je namreč pri nevtralnem pH nestabilnih, saj pride do porušanja proteinske strukture (B. Turk in Turk, 2009; V. Turk in sod., 2012; Vizovisek in sod., 2015). Poleg pH njihovo aktivnost omejujejo še drugi mehanizmi, ki preprečujejo nekontrolirano znotrajcelično razgradnjo. Katepsini so kot večina proteaz regulirani na ravni transkripcije, translacije in kompartmentalizacije. Sintetizirani so v obliki neaktivnih zimogenov s propeptidom, ki z vezavo na aktivno mesto prepreči aktivnost proteaze. Ko pride do cepitve (z drugo proteazo ali avtokatalitično) in disociacije propeptida, lahko proteaza postane aktivna (B. Turk in sod., 2012).

Aktivnost proteaz uravnavajo tudi inhibitorji, ki jih je po številu bistveno manj kot proteaz. Med inhibitorje katepsinov prištevamo cistatine, tiropine in serpine. Najpomembnejši znotrajcelični inhibitorji so cistatini tipa 1, kamor uvrščamo stefin A in B. Stefina A je zastopan v visokih koncentracijah v različnih epitelih in nekaterih krvnih celicah; stefin B pa je vseprisoten in se izraža v višjih koncentracijah kot stefin A. Oba stefina sta močna inhibitorja katepsinov L, S in H (Caglic in sod., 2007; V. Turk in sod., 2012). Med zunajcelične inhibitorje pa spadajo cistatini tipa 2, kamor sodijo cistatini S, SA, SN, D, E/M in F ter najbolj opisani cistatin C. Nahajajo se v telesnih tekočinah in inhibirajo cisteinske katepsine in legumain kot tudi parazitske proteaze (krucipain) (Repnik in sod., 2012; V. Turk in sod., 2012; Završnik in sod., 2017).

V primeru porušanja zaščitnih barier pride do razvoja različnih patoloških stanj, med katere prištevamo rakava obolenja, artritis, aterosklerozo in druge avtoimunske bolezni. Dokazano je bilo, da so bili katepsini pri teh obolenjih prekomerno izraženi in pogosto tudi prisotni izven celic (Fonovic in Turk, 2014; V. Kaminsky in Zhivotovsky, 2012; Kramer in sod., 2017; V. Turk in sod., 2001; Vasiljeva in sod., 2007). Poleg tega študije nakazujejo, da v primeru permeabilizacije lizosomov katepsini, sproščeni v citosol, ohranijo aktivnost dovolj dolgo, da imajo pomembno vlogo pri različnih poteh celične smrti; vplivajo pa lahko tudi na procese v jedru in zunajceličnem prostoru (Droga-Mazovec in sod., 2008; Fonovic in Turk, 2014; Vasiljeva in Turk, 2008).

1.4.2 Lizosomotropiki

Nepravilno delovanje in porušenje morfologije lizosomov sta lahko posledica bodisi osmotske bodisi neposredne lize membrane. Osmotska liza nastane, ko je v lumnu lizosoma prisotna visoka koncentracija topnih delcev ali ko pride do naluknjanja membrane, kar privede do vdora vode v organel. V drugo skupino destabilizatorjev uvrščamo reagente, ki imajo pri določenih koncentracijah lastnost detergenta (Gomez-Sintes in sod., 2016; Repnik in sod., 2014; Villamil Giraldo in sod., 2014).

Za sprožitev lize znotrajceličnih membran so potrebne visoke koncentracije zunajceličnih lizosomotropikov, saj v nasprotnem primeru pride zgolj do poškodb plazmaleme. Lizosomotropične spojine so običajno šibke baze, ki zaradi protonacije v kislem pH ostanejo ujete znotraj lizosomov. Večina teh spojin vpliva zgolj na povišanje pH in na velikost samih veziklov. Najbolje raziskani so bafilomicin A, klorokin in amonijev klorid (Cesen in sod., 2013; Repnik in sod., 2014). Lizosomski detergenti pa lahko destabilizirajo membranske lipide in posledično pride do LMP. Med sintetične prištevamo amine s hidrofobnimi stranskimi verigami (imidazol in morfolin), L-leucil-L-leucin metil ester (LLOMe), N-dodecilimidazol (NDI), O-metil-serin-dodecilamid-hidroklorid (MSDH) ter druge (tabela 2). Sfingozin, ROS in nekateri toksini pa so naravni sprožilci LMP.

Tabela 2: Sprožilci LMP.

Lizosomski detergent		Delovanje	Vir
sintetični	imidazol morfolin	amin, ni popolnoma znano, ali vpliva samo na membrano lizosomov ali tudi na plazmalemo	(Miller in sod., 1983)
	MSDH	nizke koncentracije sprožijo LMP, porušenje homeostaze železa, oksidativni stres itd.; visoke koncentracije sprožijo nekrozo	(M. Ghosh in sod., 2011; W. Li in sod., 2000)
	NDI	mehanizem ni popolnoma znan, vendar najverjetneje naluknja zgolj plazmalemo, povzroči pa dvig pH v lizosomih, brez LMP	(Hafner Česen in sod., neobjavljena raziskava; (Wilson in sod., 1987))
	kinolonski antibiotiki (ciprofloksacin, norfloksacin)	mehanizem ni popolnoma znan, vendar se akumulirata v lizosomih in aktivirata v prisotnosti UV svetlobe	(Boya, Andreau, in sod., 2003; Boya, Gonzalez-Polo, in sod., 2003)
	LLOMe	akumulacija znotraj lizosoma, po polimerizaciji s katepsinom C pridobi membranolitične lastnosti	(Droga-Mazovec in sod., 2008; Thiele in Lipsky, 1990)
naravni	sfingozin	sfingomielin pretvori sfingimielinaza v ceramid, ki se s ceramidazo spremeni v sfingozin; njegovo kopičenje vpliva na stabilnost membran v odvisnosti od pH	(Villamil Giraldo in sod., 2014; Young in sod., 2013)
	ROS	vplivajo na peroksidacijo lipidov in destabilizacijo membranskih proteinov v lizosomih; preko PLA2 naj bi vplivali tudi na produkcijo arahidonske kisline, ki ima lastnosti detergenta	(Aits in Jaattela, 2013; Cesen in sod., 2012; Kurz in sod., 2011; Terman in Brunk, 2004)
	virusni, bakterijski, glivni in kačji toksini	tvorijo pore, razgrajujejo membrano ipd.	(Aits in Jaattela, 2013)

LLOMe je izmed vseh najbolj okarakteriziran sintetični lizosomski detergent. Po pasivnem prehodu preko membran se akumulira znotraj lizosomov, kjer polimerizira v hidrofobne verige s pomočjo katepsina C (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008; Ransom in Reeves, 1983; Thiele in Lipsky, 1990). Zaradi svoje učinkovitosti je bil uporabljen v klinični študiji, kjer

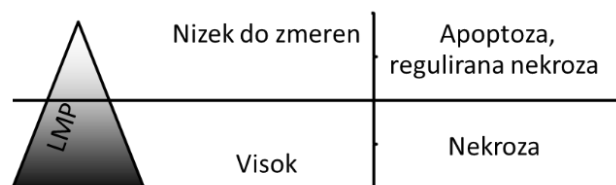
so z njegovo uporabo poskušali odstraniti perforin pozitivne citotoksične celice T in naravne celice ubijalke iz limfocitne infuzije za paciente s transplantacijo kostnega mozga. Ker pa se je izkazalo, da sproži LMP in posledično celično smrt tudi v ne-imunskih celicah, so študijo prekinili (Filicko-O'Hara in sod., 2009; Kirkegaard in Jaattela, 2009).

1.4.3 Lizosomska celična smrt

Posledica LMP je prehajanje katepsinov iz lizosomskega lumna v citosol. Njihova aktivnost je sicer v citosolu nižja kot znotraj endolizosomskih veziklov, vendar lahko kljub temu pride do poškodb same celice. Posledice so odvisne od obsega LMP in znotrajceličnih proteaznih inhibitorjev (Galluzzi in sod., 2014; Stoka in sod., 2006; B. Turk in Turk, 2009).

Pomembno je, da ločimo, kdaj pride do LMP v poteku celične smrti. LMP ima lahko ključno vlogo kot sprožilec tako kot v primeru tretiranja celic z LLOMe (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008). V nekaterih primerih pa LMP deluje kot ojačevalec signala ali pa je sekundarni dogodek kot posledica signala, ki je bil sprožen nekje drugje v celici. To je bilo prikazano v študiji, kjer so v različnih celičnih linijah sprožili receptorsko pot apoptoze s TRAIL in CD95. Dokazali so, da inhibicija katepsinov ne vpliva na samo celično smrt, lahko pa jo preprečijo z uporabo pan-kaspaznega inhibitorja (Repnik in sod., 2012; Spes in sod., 2012).

Če je LMP obsežen, celica umre z nekrozo (slika 9). Pri nekrozi poleg sproščenih katepsinov k poteku celične smrti prispevajo še povišan oksidativni stres in obremenitev z železom, ki je presnovni produkt (Galluzzi in sod., 2014; Vanden Berghe in sod., 2014).



Slika 9: Raven LMP vpliva na celično smrt. Ko je raven LMP nizka ali zmerna, lahko celica sproži reševalni mehanizem preko lizofagije oz. poteče apoptoza ali pa ena izmed oblik regulirane nekroze. Ko je raven LMP previsoka, celica umre z nekrozo. Povzeto po (Kavcic in sod., 2016).

V kolikor je LMP zmeren, pride do sprožitve apoptoze ali ene izmed oblik regulirane nekroze (slika 9). Pri apoptozi naj bi katepsini, sproščeni v citosol, cepili Bid v tBid, kar nakazuje na povezavo z MOMP, razgradili pa naj bi tudi antiapoptotske proteine Bcl-2, Bcl-XL in Mcl-1, ki služijo kot inhibitorji Bax in Bak. Poleg tega naj bi inaktivirali tudi XIAP, ki je inhibitor kaspaz (Droga-Mazovec in sod., 2008; Repnik in sod., 2012; B. Turk in Turk, 2009). Nekroptoza, ki je najboljše proučevana oblika regulirane nekroze, ravno tako vključuje LMP (slika 10), vendar je njegova funkcija odvisna od vrste celic in mikrookolja. Običajno pa pride do LMP že v fazi razkroja in zato ni primarni vzrok smrti (Ofengeim in Yuan, 2013; Vanden Berghe in sod., 2010). V lizosomih je shranjeno redoks-aktivno železo, ki je vključeno v potek Fentonove reakcije. Pri tem nastajajo ROS, ki pri ferroptozni poškodujejo lipide (slika 10), zato ni presenetljivo, da lahko ferroptozo inhibiramo s kelatorji železa in lipofilnimi antioksidanti. Čeprav pride do destabilizacije lizosomov, pa vloga LMP pri ferroptozni ni popolnoma pojasnjena (Dixon in Stockwell, 2014; Galluzzi in sod., 2018; Kurz in sod., 2011). Prav tako v primeru oksitoze (slika 10) ROS poškodujejo membranske lipide. Vendar je za sam potek celične smrti potreben še dodaten stimulacijski dejavnik, kot sta vdor kalcija v celico in aktivacija kalpainov, ki naj bi povzročili LMP. Kubota in sodelavci pa so potrdili, da je LMP drugotnega pomena (Henke in sod., 2013; Kubota in sod., 2010).

Piroptozo, ki je litična oblika celične smrti in vključuje kaspazi 1 in 11, lahko sprožijo bakterijski toksini, različni kristali, lizosomski detergenti, ROS itd. Schilling je predlagal, da nizka raven LMP sproži vdor Ca^{2+} in iztok K^{+} ionov ter nastanek inflammasoma. Posledica tega je cepitev pro-IL-1 β v zrelo obliko IL-1 β , ki se sprosti iz celic. V primeru visoke ravni LMP pa je nastanek inflammasoma inhibiran in posledično ne pride do izločanja IL-1 β . Številne študije nakazujejo, da imajo katepsini pomembno vlogo pri tej obliki celične smrti, vendar pa še ni pojasnjeno, ali sprožijo nastanek inflammasoma posredno ali neposredno. Katepsin B naj bi bil poleg adapterskega proteina ASC (angl. apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) vključen v piroptozo, kjer pride do izločanja pro-inflamatornega mediatorja HMGB1 (Katsnelson in sod., 2016; Lima in sod., 2013; Schilling, 2016; Vanden Berghe in sod., 2014). Ena izmed fiziološko pomembnih oblik celične smrti je tudi kornifikacija. V citosolu keratinocitov so dokazali prisotnost legumaina, katepsinov V in L, cistatin M/E pa naj bi bil kot

Namen dela in hipoteze

Oksidativni stres je posledica prekomernega nastajanja ROS in neučinkovite antioksidativne obrambe. Zato ni presenetljivo, da je proučevanje škodljivih učinkov ROS na celice ter organizme in preprečevanje posledic z različnimi antioksidanti v polnem razmahu. Doslej je dobro znano, da imajo ROS pomembno vlogo pri klasični nekrozi, vendar je njihov vpliv pri drugih oblikah celične smrti precej neznan. Zadnjih nekaj let je prineslo revolucijo v poimenovanju oblik celične smrti in njihovem razumevanju. Natančno poznavanje mehanizma celične smrti in regulacije le-te z ROS je ključno za razvoj novih terapevtskih pristopov in preprečevanje morebitnih stranskih učinkov zdravljenja.

Namen doktorskega dela je bil opredeliti vlogo ROS kot signalnih molekul v štirih različnih oblikah celične smrti: s TNF sproženi ekstrinzični apoptozi in nekroptozi, s staurosporinom sproženi intrinzični apoptozi in z menadionom sproženi nekrozi. Doslej so namreč različne študije pokazale, da so ROS prisotne v različnih oblikah celične smrti, vendar njihova množina in vloga pri signalizaciji nista bili natančno opredeljeni. V nadaljevanju smo želeli raziskati, kako učinkoviti so štirje eksogeni antioksidanti (NAC, α TOC, MnTBAP in Tempol) z različnim delovanjem pri preprečevanju nastanka ROS in celične smrti.

Delovne hipoteze so bile:

1. Množina sproščenih ROS ni enaka med različnimi oblikami celične smrti.
2. Z uporabo različnih antioksidantov lahko vplivamo na oksidativni stres in celično smrt, sproženo z izbranimi sprožilci celične smrti.
3. ROS imajo pomembno vlogo signalnih molekul pri celični smrti.

Lizosomi so organeli, ki vsebujejo številne hidrolaze in sodelujejo pri razgradnji in recikliranju različnih komponent. Vključeni so v številne celične procese, kot sta avtofagija in endocitoza, regulirajo celično signaliziranje in metabolizem, tesno so povezani tudi s celično smrtjo. Če pa se pot razgradnje prekine ali okvari, lahko pride do razvoja različnih bolezenskih stanj. Zaradi njihove pomembne vloge v celični homeostazi so lahko potencialne tarče za zdravljenje. Ena izmed učinkovitih terapevtskih strategij je LMP (permeabilizacija lizosomske membrane), ki ga lahko sprožijo različni lizosomotropični detergenti. Kot pravi lizosomotropični detergent deluje LLOMe, katerega mehanizem delovanja še ni popolnoma pojasnjen.

Zato je bil namen drugega dela doktorske naloge pojasniti potek in molekularne mehanizme, sprožene z lizosomotropičnim detergentom LLOMe.

4. S študijo smo želeli preveriti delovno hipotezo: 4.LLOMe v lizosomih s povišanim pH najprej polimerizira v prisotnosti katepsina C, nato pa pride do naluknjanja lizosomske membrane. Katepsini, ki se pri tem sprostijo v citoplazmo, pa so odgovorni za potek celične smrti.

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

3.1.1.1 Inhibitorji in antioksidanti

- zVAD (benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon; N-1560.0005; Bachem AG)
- cikloheksimid (C7698; Sigma)
- nekrostatin-1 (N9037-10MG; Sigma Aldrich)
- α -tokoferol (T3251; Sigma Aldrich)
- N-acetilcistein (A9165-5G; Sigma Aldrich)
- MnTBAP (manganov (III) tetrakis(4-benzojska kislina) porfirin; 475870-25MG; Sigma)
- Tempol(4-hidroksi-2, 2, 6, 6-tetrametilpiperdin 1-oksil; 176141-5G; Sigma)
- E64d ((2S,3S)-trans-epoksisukcinil-leucilamido-3metil-butan etil ester; 4321-v; Peptide Research Institute)
- GlyPheDMK (1.800.854.0530; Enzyme Systems Products)

3.1.1.2 Sprožilci celične smrti in lizosomotropiki

- TNF (dejavnik tumorske nekroze; darilo prof. Vandenabeele-a)
- menadion (M2518-100G; Sigma Aldrich)
- staurosporin (569397-1MG; Sigma Aldrich)
- bafilomicin A (tlrl-baf1; Sigma)
- LLOMe (L-levcil-L-levcin metilni ester; G-2550, Bachem)

3.1.1.3 Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati

- aneksin V-PE (BMS306PE/100; Affymetrix eBioscience)
- vezavni pufer za aneksin V-PE (BMS500BB; Affymetrix eBioscience)
- propidijev jodid (P4170; Sigma Aldrich)
- karboksi-H₂DCFDA (C6827; Invitrogen,)
- akridin oranž (A1372; Invitrogen)
- MitoSOX (M36008; Invitrogen)
- Ac-DEVD-AFC (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil Kumarin; I-1725; Bachem AG)
- Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-AMC; I-1160; Bachem AG)

3.1.1.4 Ostale kemikalije

- akrilamid (N, N-metilenbisakrilamid; Serva)
- APS (amonijevpersulfat; Serva)
- bromfenol modro (Serva)
- CH₃COONa (natrijev acetat; Merck)
- CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat; Fluka)
- deoksiholna kislina (Sigma Aldrich)
- digitonin (Sigma)
- DMSO (dimetilsulfoksid; Sigma)
- DTT (ditiotreitol; Sigma Aldrich)
- EDTA (etilendiamintetraocetna kislina; Serva)
- glicerol (Serva)
- goveji serumski albumin, BSA (Sigma Aldrich)
- HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina; Serva)
- KCl (kalijev klorid; Fluka)
- KH₂PO₄ (kalijev dihidrogenfosfat; Riedel-deHaen)

- metanol (Merck)
- $MgCl_2$ (magnezijev klorid; Sigma Aldrich)
- $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat; Merck)
- NaCl (natrijev klorid; AppliChem)
- NaDS (natrijev dodecilsulfat; Thermo Scientific)
- NP-40 (Nonident P40 oz. oktilfenoksipolietoksiletanol; Roche Diagnostics)
- označevalec velikosti proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- posneto mleko v prahu (Pomurka)
- raztopina razvijalca Mediphot E90 in fiksirja Mediphot F90 (Colenta Labortechnik)
- raztopina za odstranjevanje imunskih kompleksov (angl. stripping solution) Re-Blo Plus Strong Solution (Chemicon Int.)
- reagent Bradford (Bio-Rad)
- reagent ECL za kemiluminiscenco (GE Healthcare Amersham)
- Temed (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin; Merck)
- Tris (tris(hidroksimetil)aminometan; Serva)
- TritonX-100 (oktilfenoletoksilat; Serva)
- Tween-20 (polisorbat 20; Serva)

3.1.2 Celične linije in celične kulture

- MEF – mišji embrionalni fibroblasti (pripravljeni na IJS)
- MEF wt in MEF catB/L -/- - mišji embrionalni fibroblasti divjega tipa in z izbitima genoma za katepsin B in katepsin L (podaril prof. T. Reinheckel, Freiburg)
- PyMT wt in PyMT StfB/- - primarne mišje tumorske celice adenokarcinoma mlečne žleze PyMT divjega tipa in z izbitim genom za stefin B
- L929 – trajna celična linija mišjih fibroblastov (ECACC)
- U-937 – trajna človeška linija pro-monocitov, pridobljenih pri bolniku z difuznim histiocističnim limfomom (ECACC)
- THP-1 – trajna človeška linija monocitov, pridobljenih pri bolniku z akutno mieloidno levkemijo (ECACC)
- U-87-MG – trajna človeška linija, pridobljena pri bolniku z glioblastomom multiforme (ECACC)

Vse celične linije so bile negativne pri testiranju prisotnosti bakterij iz rodu *Mycoplasma*. Primarne celične kulture (npr. MEF) smo gojili do četrte pasaže.

3.1.3 Gojišča, dodatki za gojišča in delo s celicami

- Dulbeccov pufer PBS (angl. Dulbecco's PBS, with Ca and Mg; Lonza)
- fetusni serum goveda (angl. fetal bovine serum; Sigma) FBS N (navaden) in FBS HI (toplotno obdelan; angl. heat inactivated)
- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (angl. DMEM, high glucose, with L-glutamine; Gibco)
- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (angl. DMEM, high glucose, with L-glutamine; Sigma)
- gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom (Sigma)
- mešanica penicilina in streptamicina (Sigma)
- stabilni L-glutamin (Lonza)
- TrypLE Select/ trypsin (Gibco)

3.1.4 Protitelesa

3.1.4.1 Primarna protitelesa

- kunčja poliklonska protitelesa proti LC3 (ab51520; Abcam)
- mišja monoklonska protitelesa proti β -aktinu (A1978; Sigma Aldrich)
- kunčja poliklonska protitelesa proti $I\kappa B$ - α (9242; Cell Signalling Technology)
- kunčja monoklonska protitelesa proti GAPDH (2118S; Cell Signalling Technology)

- mišja monoklonska protitelesa proti humanemu katepsinu B (klon 3E1, pripravljena na IJS)
- kozja poliklonska protitelesa proti mišjemu katepsinu B (AF965; R&D Systems)
- mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu C (sc-74590; klon D-6, Santa Cruz)
- mišja monoklonska protitelesa proti humanemu katepsinu D (klon D101, pripravljena na IJS)
- mišja monoklonska protitelesa proti humanemu katepsinu L (klon CPL33/1, ab62710; Abcam)
- kozja poliklonska protitelesa proti mišjemu katepsinu L (AF1515; R&D Systems)
- kozja poliklonska protitelesa proti humanemu katepsinu S (AF1183; R&D Systems)
- kunčja poliklonska protitelesa proti stefinu B (ab53725; Abcam)

3.1.4.2 Sekundarna protitelesa

- kozja antimišja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (115-035-068; Jackson ImmunoResearch)
- kozja antikunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (111-035-045; Jackson ImmunoResearch)
- oslovska antikozja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (ab6885; Abcam)

3.1.5 Pufri in raztopine

Pufer RIPA:

50 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
0,1 % (w/v) NaDS
1 % (w/v) NP-40
0,5 % (w/v) deoksiholna kislina
1 mM EDTA
pH 8,0

Kaspazni pufer:

100 mM HEPES
200 mM NaCl
20 % (w/v) saharoza
0,2 % (w/v) CHAPS
2 mM EDTA
pH 7 (umerimo z NaOH)

Acetatni pufer (z detergenti):

50 mM CH₃COONa
100 mM NaCl
1 % w/v NP-40 – predhodno odtajamo oz. damo iz hladne sobe na sobno temperaturo, da postane tekoče
0,5 % w/v Triton X-100
0,5 mM EDTA
pH 5,6

Pufra za pripravo poliakrilamidnih gelov in sestava poliakrilamidnih gelov:

Koncentracijski pufer (4x):

0,5 M Tris
pH 6,8 (umerimo s HCl)

Ločevalni pufer (4x):

1,5 M Tris
pH 8,8 (umerimo s HCl)

Tabela 3: Sestava poliakrilamidnih gelov.

sestavina	12,5 % ločevalni gel	koncentracijski gel
akrilamid	3,13 ml	625 μ l
ločevalni pufer (4x), pH 8,8	2,5 ml	/
koncentracijski pufer (4x), pH 6,8	/	1,25 ml
destilirana voda	4,27 ml	3,075 ml
10 % NaDS	100 μ l	50 μ l
TEMED	20 μ l	10 μ l
10 % APS	40 μ l	20 μ l

Nanašalni pufer Laemmli za NaDS PAGE (6x):

0,5 M Tris, pH 6,8 (= koncentracijski pufer (4x) za pripravo gelov)
 30 % (v/v) glicerol
 10 % (w/v) NaDS
 0,012 % (w/v) barvilo bromfenol modro
 1 mM DTT

Elektroforezni pufer za NaDS PAGE:

25 mM Tris
 192 mM glicin
 3,5 mM NaDS

Prenašalni pufer za prenos western:**Prenašalni pufer za prenos western (10x):**

248 mM Tris
 1,9 M glicin

Prenašalni pufer za prenos western (1x) – za 1 l:

100 ml 10x pufra za prenos western
 200 ml metanola
 700 ml destilirane vode

Pufer PBS:**Pufer PBS (10x):**

8,5 % (w/v) NaCl
 0,39 % (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 1,34 % (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Pufer PBS (1x) s Tween 20 – za 1 l:

100 ml 10x pufra PBS
 500 μ l Tween-20
 900 ml destilirane vode

Raztopina posnetega mleka v prahu:

5 % (w/v) mleko v prahu
 pufer PBS (1x) s Tween 20

3.1.6 Laboratorijska oprema

- avtomatske pipete z volumni 0,1–2,5 μ l, 0,5–10 μ l, 2–20 μ l, 20–200 μ l in 100–1000 μ l (Eppendorf)
- centrifugi 5415R in 5810R (Eppendorf)
- digestorij (Wesemann)
- fazno kontrastni svetlobni mikroskop CX 40-RPLS (Olympus)
- filmi Biomax Light Film (Kodak)
- bralnik mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 in Sapphire (Tecan)
- hladilniki in zamrzovalniki

- inkubator s kontrolirano atmosfero – 37 °C in 5 % CO₂ (Binder)
- kadička za NaDS PAGE Mini PROTEAN Tetra Cell 52BR (BioRad)
- kadička za prenos western TE22 (Hoefer)
- kaseta za razvijanje filmov X-omatic regular screens (Kodak)
- laminar M18 (Iskra PIO)
- ledomat AF200 (Scotsman)
- magnetno mešalo D-6011 (NeoLAB)
- naprava za NaDS PAGE in prenos western EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)
- naprava za razvijanje filmov SRX-101A (Konica Minolta)
- Neubauerjeva števna komora (Improved Neubauer, Blaubrand)
- nitrocelulozna membrana NC45 (Serva)
- pH meter MP220 (Mettler Toledo)
- pipetor (Brand/Eppendorf)
- potrošni material za enkratno uporabo za delo s celicami (centrifugirke, Petrijeve posode ... (Greiner); tkivne plošče, zamrzovalne vialne, strgalo za celice ... (TPP); epruvete za pretočni citometer (Falcon))
- posode za tekoči dušik Arpege 40/70 (Air Liquide)
- pretočni citometer FACSCalibur (BD)
- skrinja s temperaturo -80 °C (Sanyo)
- steklovina (čase (Simax), erlenmajerice (Schott), merilni valji, pipete, Pasteurjeve pipete (Brand ...)
- stresalnik Vibromix 314 EVT (Tehtnica)
- tehtnici PB5001-S in AB104-S (Mettler Toledo)
- termomešalnik Thermomixer compact (Eppendorf)
- ultrazvočni razbijalec W-405D (Branson)
- vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica)

3.2 Metode

3.2.1 Osnovne metode dela s celicami

3.2.1.1 Priprava gojišč in gojenje celičnih linij

Kompletno gojišče za celične kulture MEF in PyMT vsebuje:

- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (Gibco)
- 10 % FBS N
- 2 mM stabilni L-glutamin
- 100 U/ml penicilina; 0,1 mg/ml streptomicina

Kompletno gojišče za celični liniji L929 in U-87-MG vsebuje:

- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (Sigma)
- 10 % FBS N
- 2 mM stabilni L-glutamin
- 100 U/ml penicilina; 0,1 mg/ml streptomicina

Kompletno gojišče za celični liniji U-937 in THP-1 vsebuje:

- gojišče RPMI z L-glutaminom (Sigma)
- 10 % FBS HI
- 2 mM stabilni L-glutamin
- 100 U/ml penicilina; 0,1 mg/ml streptomicina

Celice smo gojili v inkubatorju v nadzorovani atmosferi, nasičeni z vodno paro, pri 37 °C in 5 % CO₂. Primarne celice smo uporabljali zgolj do 4. pasaže, celično linijo pa smo gojili največ do 25. pasaže.

3.2.1.2 Priprava primarnih celic mišjih embrionalnih fibroblastov

12,5 oz. 13,5 dni po parjenju smo breje miši žrtvovali z dislokacijo vratnih vretenc. Kožo in potrebušnico smo prerezali in sterilno odvzeli maternico z zarodki. Maternico smo najprej sprali s pufrom PBS, nato pa posamezne zarodke prenesli v sterilno petrijevko ter jim odstranili glave in rdeče organe (srce in jetra). Zarodke (po dva ali tri skupaj) smo nato razrezali in prenesli v čašo s steklenimi kroglicami in magnetnim mešalom. Dodali smo 10 ml 0,25 % TrypLE Select-a in inkubirali 15 minut pri 37 °C z mešanjem. Tripsinizacijo smo ustavili z dodatkom 10 ml kompletnega gojišča, tripsinizat pa smo centrifugirali 5 minut pri 400 x g. Supernatant smo odsesali, usedlino pa smo resuspendirali v 10 ml svežega kompletnega gojišča. Celično suspenzijo smo nato prenesli na ploščo z 10-centimetrskim premerom. Naslednji dan smo zamenjali gojišče in celice gojili, dokler niso dosegle 90 % preraščenosti. Nato smo celice precepili na plošče s 15-centimetrskim premerom in jih zamrznili, ko so prerasle celotno površino (J. Xu, 2005).

Primarne celice mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa in z izbitimi geni za katepsin B in katepsin L (MEF wt in MEF catB/L -/-) je podaril prof. T. Reinheckel.

3.2.1.3 Priprava primarnih celic mišjih tumorskih celic adenokarcinoma mlečne žleze (PyMT wt in PyMT stfB -/-)

Primarne mišje tumorske celice adenokarcinoma mlečne žleze PyMT wt in PyMT stfB -/- so bile izolirane in gojene v skladu s protokolom (Vasiljeva in sod., 2006). Izolirane tumorske celice genotipa PyMT w in PyMT stfB -/- smo gojili v kompletnem gojišču za celične kulture (sestava navedena v poglavju 3.2.1.1). Celice smo gojili v inkubatorju v nadzorovani atmosferi, nasičeni z vodno paro in 5 % CO₂, pri 37 °C. Celice smo uporabljali do 4. pasaže.

3.2.1.4 Odmrzovanje celic

Celice smo vzeli iz tekočega dušika oziroma iz zamrzovalnika s temperaturo -80 °C in jih odtalili v predhodno segreti vodni kopeli (37 °C). Odtaljene celice smo prenesli v 5 ml kompletnega ogretega medija. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 400 x g. Supernatant smo odsesali z vakuumsko črpalko in usedlino resuspendirali v 10 ml svežega kompletnega medija ter prenesli na ploščo z 10-centimetrskim premerom.

3.2.1.5 Precepljanje adherentnih celic

Ko so celice v celoti prerasle površino plošče, smo odstranili izrabljeno gojišče, sprali s pufrom PBS in dodali raztopino za ločevanje celic od podlage TrypLE Select. Količina pufru PBS in raztopine TrypLE Select je bila odvisna od površine plošče, na kateri smo gojili celice (na primer: na ploščo z 10-centimetrskim premerom smo dodali 2 ml raztopine). Ploščo smo nato prenesli v inkubator, dokler se celice niso ločile od podlage (čas inkubacije se je razlikoval med posameznimi celičnimi modeli, običajno je bilo med 2 in 5 min). Odlepljenim celicam smo nato dodali nekaj kompletnega medija ter suspenzijo prenesli v centrifugirko. Ker je FBS v kompletnem mediju inaktiviral delovanje raztopine TrypLE Select, celične suspenzije ni bilo treba centrifugirati. Celice smo nato razdelili na različne plošče v odvisnosti od potreb za poskus.

3.2.1.6 Precepljanje suspenzijskih celic

Suspenzijske celice smo gojili do gostote 10⁶ celic/ml. Nato smo jim dodali ustrezen volumen kompletnega medija, da je bila končna gostota 3 x 10⁵ celic/ml.

3.2.1.7 Zamrzovanje celic

V celoti preraščeno ploščo smo najprej tripsinizirali. Ko so se celice ločile od podlage, smo celično suspenzijo centrifugirali 4 minute pri 400 x g. Supernatant smo odsesali z vakuumsko črpalko in usedlino resuspendirali v zamrzovalnem mediju. Zamrzovalni medij je vseboval 90 % FBS in 10 % DMSO. Koncentracija zamrznjenih celic je bila 1–1,6 x 10⁶ celic/ml. Zamrznjene celice smo shranili v zamrzovalniku s temperaturo -80 °C za nekaj mesecev; za daljše obdobje pa smo jih shranili v tekočem dušiku.

3.2.2 Tretiranje celic

Celice smo nacepili na različne plošče v odvisnosti od potreb poskusa in jih gojili čez noč. Naslednji dan smo pripravili ustrezne redčitve inhibitorjev, antioksidantov in sprožilcev celične

smrti in jih dodali celicam. Celice smo z inhibitorji in antioksidanti inkubirali 2 uri, razen v primerih, ko je označeno drugače. V netretiranih vzorcih smo le zamenjali staro gojišče s svežim. Po končani predinkubaciji z inhibitorji in antioksidanti smo celicam v gojišče dodali ustrezne koncentracije sprožilcev celične smrti oz. lizosomotropikov. Po končani inkubaciji s sprožilci smrti smo celice pripravili za zeleno analizo.

Tabela 4: Končne koncentracije inhibitorjev, antioksidantov in sprožilcev smrti v gojišču.

končna koncentracija v gojišču glede na celice		MEF	L929
inhibitor	CHX	1 µg/ml	/
	zVAD	20 µM	/
	Nec1	10 µM	20 µM
antioksidant	NAC	0–5 mM	0–5 mM
	αTOC	0–10 mM	0–10 mM
	MnTBAP	0–75 µM	0–75 µM
	Tempol	0–10 mM	0–10 mM
sprožilec celične smrti	MD	75 µM	75 µM
	STS	1 µM	1 µM
	TNF	100 ng/ml	10 ng/ml

Tabela 5: Končne koncentracije inhibitorjev in lizosomotropikov.

končna koncentracija v gojišču		
inhibitor	GlyPheDMK	10 µM
	E64d	5 ali 20 µM
	zVAD	20 µM
lizosomotropik	LLOMe	0–5 mM
	Bafilomicin	30 nM

3.2.3 Meritve na pretočnem citometru

3.2.3.1 Določanje deleža mrtvih celic

Celice smo nacepili na ploščo s 6 (MEF), 12 (PyMT) ali 24 vdolbinicami (L929, U-937, THP-1 in U-87-MG) in jih pustili rasti čez noč v inkubatorju. Po tretiranju in končani inkubaciji z različnimi sprožilci smrti smo v epruveti za pretočni citometer zbrali nepritrjene celice in pritrjene celice po tripsinizaciji. Vzorce smo centrifugirali 4 minute pri 400 x g. Supernatant smo odsesali z vakuumsko črpalko, usedlino iz celic pa smo resuspendirali v ustreznem pufru z aneksinomV-PE. Po 15-minutni inkubaciji smo dodali še propidijev jodid.

Pri zdravih celicah ne zaznamo nobenih sprememb na plazemski membrani, tekom apoptoze pa se na zunanjo stran plazemske membrane izpostavi membranski fosfolipid fosfatidilserin. AneksinV-PE se z visoko afiniteto veže na izpostavljen fosfatidilserin. Ker ima aneksinV vezan fluorokrom fikoeritrin, lahko s pretočnim citometrom detektiramo zgodnjo apoptotsko fazo. Celice v pozni apoptotski fazi in nekrotične celice imajo poškodovano plazemsko membrano, zato se obarvajo tako z aneksinom V kot tudi s propidijevim jodidom. Propidijev jodid je interkelator, ki se veže med bazne pare DNA. Ker imajo žive celice nepoškodovano plazemsko membrano, ostanejo celice neobarvane.

Za analizo vzorcev smo uporabili pretočni citometer FACSCalibur in program CellQuest™ v 3.3.

3.2.3.2 Spremljanje nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti

Celice smo nacepili na ploščo s 6 (MEF) ali 24 vdolbinicami (L929, U-937, THP-1 in U-87-MG) in jih pustili rasti čez noč v inkubatorju. Po tretiranju in končani inkubaciji z različnimi sprožilci smrti smo gojišče prenesli v FACS-epruvete, pritrjene celice pa smo sprali z ogretim pufrom PBS. Epruvete s plavajočimi celicami smo centrifugirali 4 minute pri 400 x g, supernatant smo nato odstranili in celični pelet resuspendirali v reagentu CM-H₂DCFDA s končno koncentracijo 5 µM (pripravljen v skladu z navodili proizvajalca). Celično suspenzijo smo nato prenesli na ustrezne pritrjene celice. Po inkubaciji z reagentom CM-H₂DCFDA (15–30 minut) smo pritrjene celice tripsinizirali in celotne vzorce prenesli v ustrezne epruvete. Vzorce smo ponovno centrifugirali,

supernatant smo odstranili, usedlino pa smo resuspendirali v pufru PBS. Vzorce smo analizirali na pretočnem citometru FACSCalibur s programom CellQuest™ v 3.3.

Reagent CM-H₂DCFDA, ki emitira pri 517–527 nm, po prehodu v celico cepijo esterase. Pri tem nastane spojina, ki ostane ujeta v celici in reagira s kisikovimi radikali. Pri tem nastane fluorescenten produkt, zato lahko oksidacijo določimo glede na povečanje fluorescence.

Na enak način smo pripravili vzorce za spremljanje mitohondrijskih ROS. Uporabili smo reagent MitoSOX, s končno koncentracijo 5 μ M (pripravljen v skladu z navodili proizvajalca). Po 30 minutni inkubaciji z reagentom MitoSOX smo pritrjene celice tripsinizirali in celotne vzorce prenesli v ustrezne epruvete. Vzorce smo centrifugirali, supernatant smo odstranili, usedlino pa resuspendirali v pufru PBS. Vzorce smo analizirali na pretočnem citometru FACSCalibur s programom CellQuest™ v 3.3.

Reagent MitoSOX, ki emitira pri 580 nm, je specifičen za detekcijo ROS v mitohondrijih. Po reakciji s kisikovimi radikali nastane fluorescenten produkt, zato lahko oksidacijo določimo glede na povečanje fluorescence.

3.2.3.3 Določanje deleža celic s poškodovanimi lizosomi

Celice smo nacepili na ploščo s 24 vdolbinicami (U-937, THP-1 in U-87-MG) in jih pustili rasti čez noč v inkubatorju. Po tretiranju z lizosomotropičnimi reagenti smo integriteto lizosomskih membran merili na osnovi vnosa barvila akridin oranž (AO). AO se kopiči v kisljih organelih in oddaja rdečo fluorescenco. Pri celicah s poškodovanimi lizosomi ali pa z lizosomi, ki imajo povišan pH, se nakopiči manj AO, zato to zaznamo kot upad intenzitete fluorescence. Po končani inkubaciji smo v vdolbinice dodali barvilo, tako da je bila končna koncentracija 1 μ g/ml, in inkubirali 15 minut v inkubatorju. Po barvanju smo v epruvete za pretočni citometer zbrali celice in centrifugirali 4 minute pri 400 x g. Pelet smo nato resuspendirali v pufru PBS. Za analizo vzorcev smo uporabili pretočni citometer FACSCalibur in program CellQuest™ v 3.3. Vzorce smo pripravili v skladu s protokoli (Repnik, Cesen, in sod., 2016b; Repnik, Hafner Cesen, in sod., 2016).

3.2.4 Priprava celičnih lizatov in analiza proteinov

3.2.4.1 Priprava popolnega celičnega lizata

Celice smo nacepili na ploščo s premerom 10 centimetrov in jih pustili rasti čez noč. Po tretiranju in končani inkubaciji z različnimi sprožilci smrti smo gojišče prenesli v centrifugirko in centrifugirali 4 minute pri 400x g. Pelet smo nato resuspendirali v približno 20 μ l hladnega pufru RIPA. Pritrjene celice smo najprej sprali s pufrom PBS, nato pa smo jih lizirali z ohlajenim pufrom RIPA (približno 200 μ l). S praskalnikom smo mehansko ločili celice od površine plošče in vzorce zbrali v ustreznih mikrocentrifugirkah. Vzorce smo izpostavili ultrazvoku (od 5 do 10 sekund, 20 kHz) in jih centrifugirali 12 minut na 16000 x g pri 4 °C. Vzorce smo ves čas hranili na ledu. Po pripravi smo vzorce uporabili za analizo ali pa jih shranili v zamrzovalniku s temperaturo -20 °C.

3.2.4.2 Priprava citosolnega celičnega lizata

Celice smo gojili v petrijevkah s premerom 10 centimetrov in jih tretirali. Pri pripravi celičnega lizata smo imeli vse na ledu in uporabljali smo ohlajene raztopine. Citosolne lizate smo pripravili v skladu z objavljenimi protokoli (Cesen in sod., 2013; Repnik, Cesen, in sod., 2016a). Pripravili smo acetatni pufer z digitoninom (za citosolne lizate smo uporabili končno koncentracijo 75 μ g/ml in za totalne lizate 400 μ g/ml). Medij s celic smo prenesli v centrifugirko, pritrjene celice pa smo tripsinizirali. Tripsinizat oz. celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko z medijem in centrifugirali (400 g x 4 min). Supernatant smo odsesali. Celični pelet smo sprali še z ohlajenim PBS.

Celični pelet smo nato nežno resuspendirali v 200 μ l acetatnega pufru z digitoninom. Sledila je 12 minutna inkubacija na ledu s stresanjem na nizkih obratih. Tako pripravljene lizate smo centrifugirali 5 min na 1000 g. Supernatant smo nato prenesli v mikrocentrifugirko, pelet pa smo zavrgli.

3.2.4.3 Določanje koncentracije proteinov v vzorcu

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določali z metodo po Bradfordu. Predhodno smo pripravili umeritveno krivuljo z različnimi koncentracijami BSA (od 0 do 25 μ g/ml). Začetna koncentracija

BSA je bila 10 mg/ml, vmesna koncentracija pa 100 µg/ml. V posamezne vdolbinice plošče s 96 vdolbinicami smo nanegli volumne, ki so zbrani v tabeli 6. Absorbanco smo merili na spektrometru pri 595 nm.

Ko smo pripravili ustrezne redčitve vzorcev (običajno v razmerju 1:500–1:1000), smo od tega 160 µl zmešali s 40 µl Bradford reagenta in izmerili absorbanco. Celokupno koncentracijo proteinov v vzorcu smo nato izračunali iz umeritvene krivulje ustreznih redčitev BSA.

Tabela 6: Volumni BSA in vode, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje.

koncentracija BSA (µg/ml)	volumen BSA s koncentracijo 100 µg/ml (µl)	volumen prečiščene dH ₂ O (µl)	volumen Bradford reagenta (µl)
0	0	160	40
2	4	156	40
6	12	148	40
10	20	140	40
14	28	132	40
16	32	128	40
20	40	120	40
25	50	110	40

3.2.4.4 Merjenje aktivnosti kaspaze 3

Za določanje aktivnosti izbranih encimov smo uporabili sintetične fluorogene substrate. Ustreden volumen vzorca (50 µg proteinov) smo nanegli v posamezne vdolbinice črne plošče s 96 vdolbinicami in dodali do 40 µl dH₂O. Nato smo dodali še 50 µl kaspaznega pufra, da je bil celokupni volumen 90 µl, ter vzorce inkubirali 10 minut pri 37 °C. Tik pred merjenjem smo dodali 10 µl substrata Ac-DEVD-AFC (vzbujevalna svetloba 400 nm, emisijska svetloba 505 nm), da je bila končna koncentracija substrata 20 µM. Razgradnjo substrata smo merili 30 min. Encimska aktivnost je bila sorazmerna spremembi fluorescence v odvisnosti od časa (naklon).

3.2.4.5 Merjenje aktivnosti cisteinskih katapsinov

Aktivnost cisteinskih katapsinov smo določali z uporabo sintetičnega fluorogenega substrata zPhe-Arg-AMC. Ustreden volumen vzorca (40 µl) smo odpipetirali v črno mikrotitrsko ploščo ter dodali 50 µl acetatnega pufra z DTT, s koncentracijo 10 mM. Vzorce smo inkubirali 10 minut pri 37 °C. Zatem pa smo dodali 10 µl izbranega substrata, tako da je bila končna koncentracija substrata 30 µM, in izmerili fluorescenco s fluorimetrom za mikrotitrsko ploščo (Tecan Infinite M1000 Pro). Vzbujevalna valovna dolžina svetlobe za substrat je 370 nm, emisijska valovna dolžina svetlobe pa 460 nm. Sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon) je sorazmerna encimski aktivnosti.

3.2.4.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE)

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS smo uporabili za ločevanje proteinov iz predhodno pripravljenih lizatov glede na njihovo velikost. Uporabili smo 12,5 % poliakrilamidne gele (sestava je navedena v tabeli 3); elektroforeza pa je potekala v elektroforeznem pufru pri konstantnem toku 30 mA/gel.

Ustrezni količini vzorca (običajno 50 µg) smo dodali 6-kratni nanašalni pufer Laemlli z DTT (reducirajoče okolje) s končno koncentracijo 1,5x. Vzorce smo nato inkubirali 6 minut pri 95 °C in jih nanegli na gel. Za določanje velikosti proteinov v vzorcih smo nanegli proteinske standarde PageRuler.

3.2.4.7 Prenos western in imunodetekcija proteinov

Ko je bila elektroforeza končana, smo proteine z metodo prenosa western prenesli na nitrocelulozno membrano. Prenos je potekal 2,5 ure pri konstantnem električnem toku 250 mA oziroma čez noč pri konstantnem električnem toku 25 mA v prenašalnem pufru z metanolom.

Po končanem prenosu smo prosta vezavna mesta na membrani blokirali s 45-minutno inkubacijo v blokirni raztopini (5 % (w/v) posneto mleko v prahu v pufru PBS-T) pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem. Zatem smo membrano inkubirali s primarnimi protitelesi čez noč

pri 4 °C oziroma 2 h pri sobni temperaturi. Membrano smo nato spirali petkrat po 10 minut v vedno svežem pufru PBS-T in tako odstranili nevezana protitelesa. Nato smo membrano inkubirali od 30 minut do 1 ure s sekundarnimi protitelesi, ki so imela vezano hrenovo peroksidazo. Primarna in sekundarna protitelesa so bila vedno pripravljena v pufru PBS-T. Sledilo je ponovno spiranje membrane petkrat po 10 minut v vedno svežem pufru PBS-T pri sobni temperaturi. Za detekcijo proteinov na podlagi kemoluminiscence smo uporabili sistem ECL v skladu z navodili proizvajalca.

3.2.5 Statistična analiza

Vsi rezultati so predstavljeni kot povprečje s standardno napako. Vsi poskusi so bili narejeni v najmanj treh neodvisnih ponovitvah. Vsak poskus je bil sestavljen iz najmanj treh tehničnih ponovitev.

Rezultati

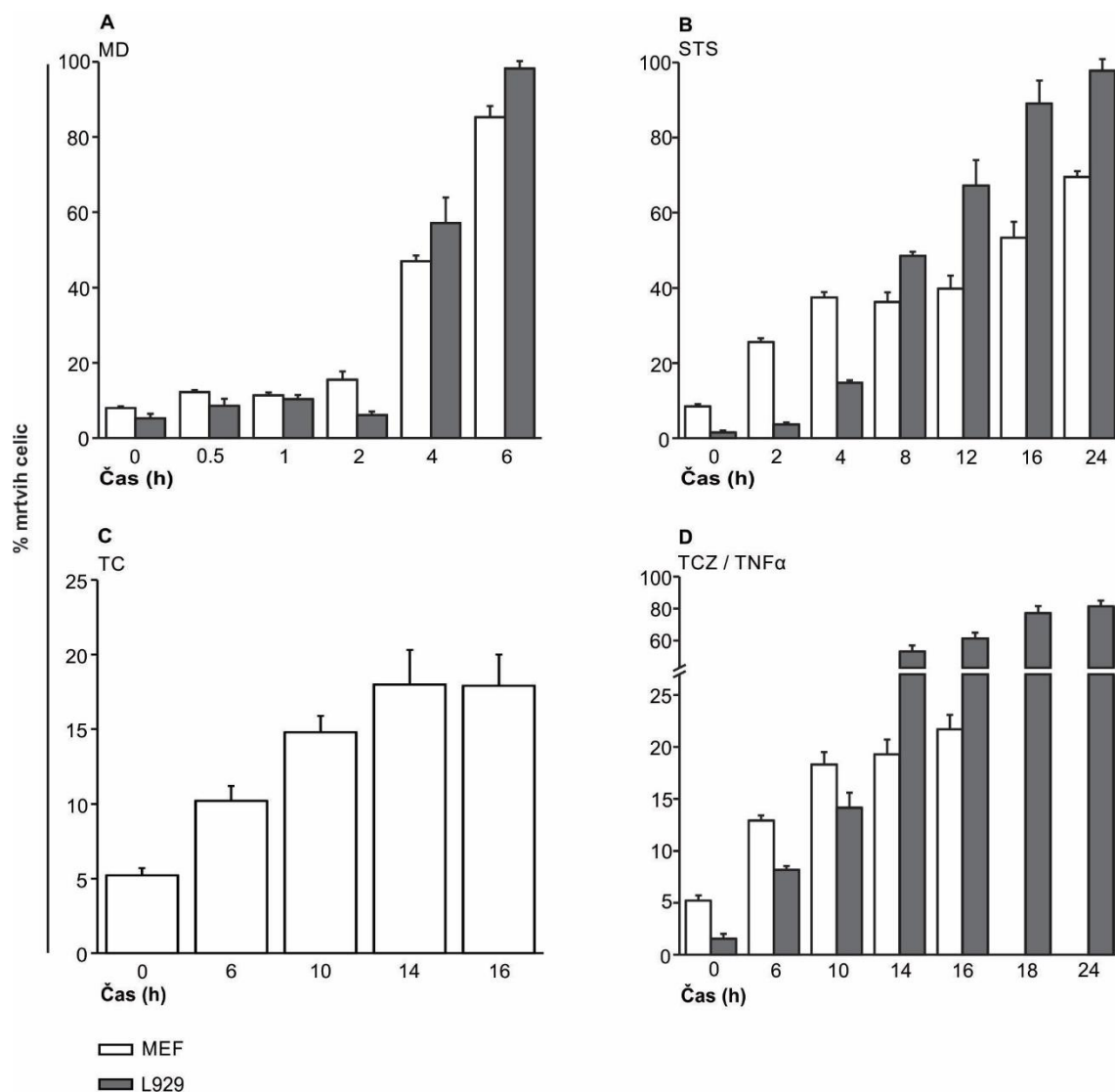
4.1 Proučevanje vpliva antioksidantov na oksidativni stres in celično smrt

4.1.1 Sprožitev celične smrti z različnimi sprožilci celične smrti

Pri proučevanju vpliva antioksidantov na oksidativni stres in celično smrt nas je najprej zanimalo delovanje različnih sprožilcev celične smrti. V poskusih smo uporabili MD kot sprožilec nekroze, STS kot sprožilec intrinzične poti apoptoze in TNF, ki lahko sproži ekstrinzično pot apoptoze ali pa nekroptozo. Zaradi morebitnih razlik v mehanizmu celične smrti smo učinek testirali na dveh različnih mišjih celičnih modelih: MEF (primarna celična kultura mišjih embrionalnih fibroblastov) in L929 (trajna celična linija mišjih fibroblastov).

V prvem koraku analiziranja celične smrti smo vzorce označili z aneksinomV, na katerega je vezan fikoeritrin (aneksinV-PE), in propidijevim jodidiom (PI). AneksinV-PE se veže na fosfatidilserin, ki se izpostavi na zunanjo stran plazemske membrane. Vezava zgolj aneksinaV-PE nakazuje na zgodnjeapoptotske celice. PI pa je DNA interkalirajoče barvilo, s katerim se pobarvajo poznoapoptotske celice kot tudi nekrotične celice (Krysko, Vanden Berghe, D'Herde, in sod., 2008; Krysko, Vanden Berghe, Parthoens, in sod., 2008; Shen Han-Ming, 2014).

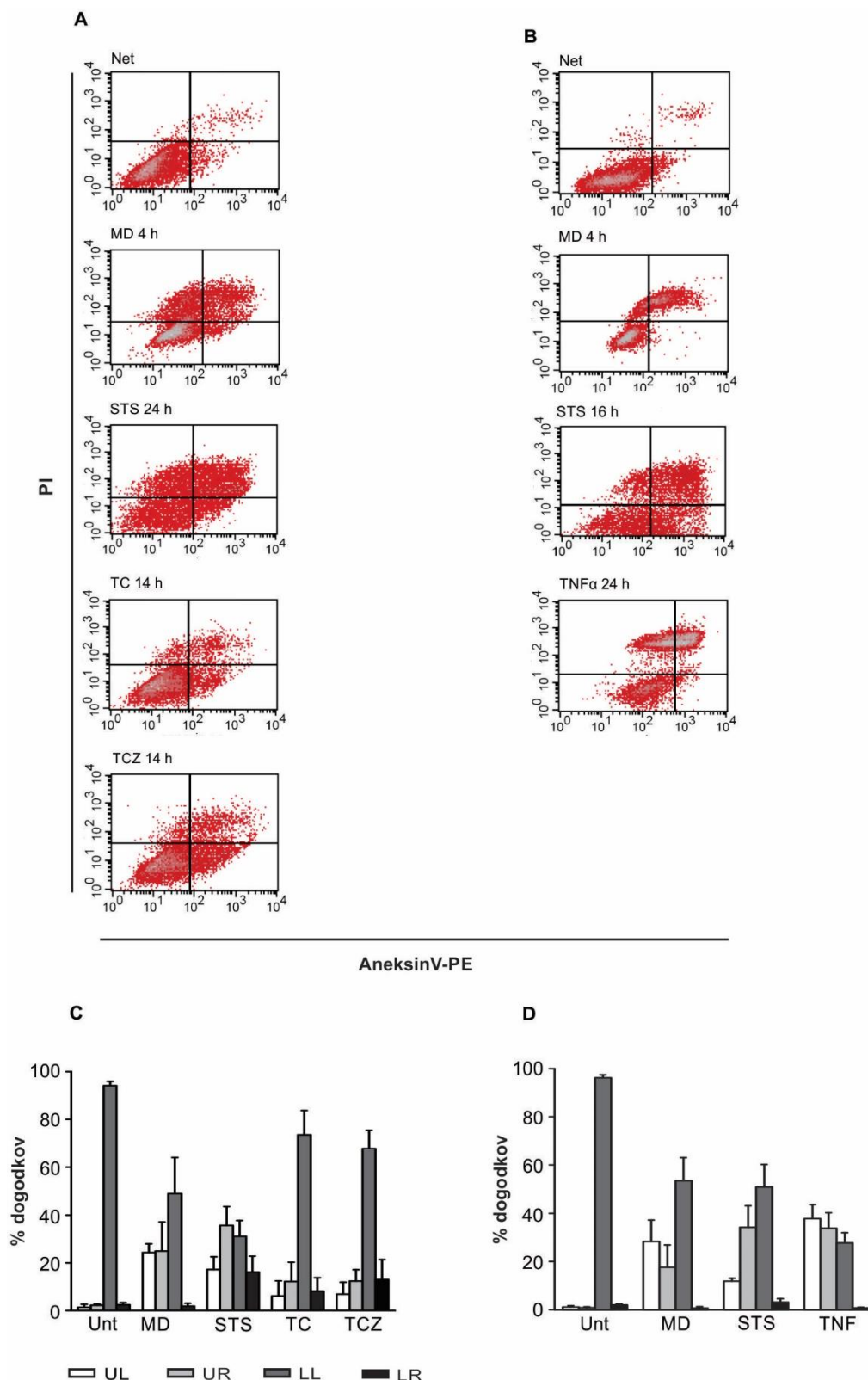
Ugotovili smo, da 75 μ M MD sproži 50–60 % celično smrt po 4-urni inkubaciji v obeh celičnih modelih. Po 6 h inkubacije pa je celična smrt že več kot 80 % (slika 11A). Ko smo celice tretirali z 1 μ M STS, je celična smrt enakomerno naraščala v odvisnosti od časa. Pri celicah MEF je bila 50 % celična smrt dosežena po 16 h, medtem ko je bila pri celicah L929 50 % celična smrt presežena že po 12 h (slika 11B). Celice MEF smo tretirali s TNF v kombinaciji s CHX, ki je inhibitor sinteze proteinov, za sprožitev ekstrinzične poti apoptoze. Iz grafa na sliki 11C je razvidno, da je po 14 h inkubacije porast mrtvih celic zgolj 15 %. Nekroptotično celično smrt smo v celicah MEF sprožili s TNF v kombinaciji s CHX in pankaspaznim inhibitorjem zVAD, v celicah L929 pa zgolj s TNF (slika 11D). Iz zbranih rezultatov je razvidno, da je 20 % mrtvih celic MEF po 14 h, medtem ko je pri celicah L929 ob isti časovni točki več kot 60 % mrtvih celic.



Slika 11: Različni tipi celične smrti v celičnih kulturah MEF in L929. Odstotek mrtvih celic po tretiranju MEF in L929 z A) 75 μ M MD, B) 1 μ M STS, C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) oziroma samo TNF (10 ng/ml) v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinV-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice so definirane kot aneksinV-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

Na sliki 12A in B so prikazani reprezentativni točkasti diagrami po tretiranju s sprožilci celične smrti ter označevanju z aneksinV-PE in PI, odstotki pobarvanih celic po posameznih kvadrantih pa so zbrani v diagramih na sliki 12C in D. Iz rezultatov je razvidno, da v vzorcih, tretiranih z MD, pride do povišanja v zgornjem levem in desnem kvadrantu, kjer so samo PI oz. PI in aneksinV-PE pozitivne celice, kar je značilno za nekrotično smrt. Ko pa smo sprožili apoptotično celično smrt s STS ali pa TC, pride do obarvanja celic samo z aneksinomV-PE (spodnji desni kvadrant), ki je značilno za predapoptotično stopnjo. Pri nekroptozu je obarvanje precej podobno kot pri apoptozi, vendar je zlasti pri celicah L929 izrazito povišanje samo PI pozitivnih celic.

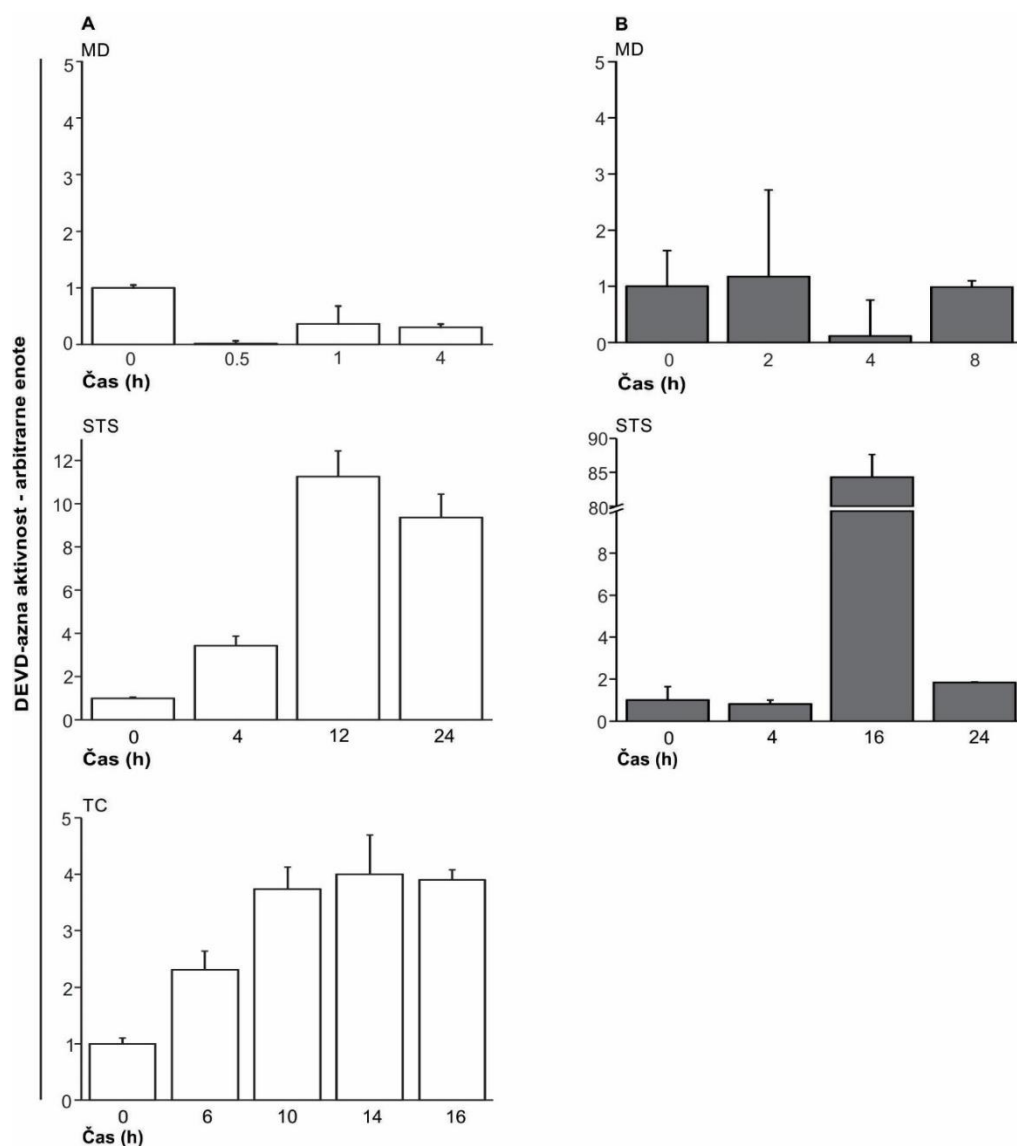
Poleg zgoraj omenjenih sprememb smo pri merjenju s pretočnim citometrom lahko opazili, da je prišlo do morfoloških sprememb znotraj populacije celic. Pri apoptozi in nekrozi smo zaznali razlike v velikosti celic (angl. forward scatter, FSC) in granuliranosti celic (angl. side scatter, SSC). Prišlo je tudi do znatnega povečanja celičnih ostankov oz. debris.



Slika 12: Celična smrt, analizirana s pretočno citometrijo. Po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti ter barvanju z aneksinV-PE in PI smo celice analizirali s pretočno citometrijo. Rezultate v določeni časovni točki smo prikazali kot točkovne diagrame oz. histograme za A) ter B) MEF in C) ter D) L929 (oznake kvadrantov: ZL – zgoraj levo, ZD – zgoraj desno, SL – spodaj levo, SD – spodaj desno). Net – netretiran.

Obarvanje zgolj z aneksinV-PE in PI ni zadosten dokaz, da so celice umrle po apoptotični ali nekrotični poti, zato smo nadalje testirali vpliv sprožilcev smrti na aktivnost kaspaz. Aktivnost kaspaz smo merili na osnovi hidrolize substrata Ac-DEVD-AFC na popolnih lizatih celic MEF in L929, ki so bili pripravljene po različnih časih inkubacije s sprožilci celične smrti.

Kaspazna aktivnost pri tretiranju s 75 μ M MD ni narasla, kar je značilno za nekrotično celično smrt (slika 13A, B). Aktivnost kaspaz pa smo zaznali pri tretiranju celic MEF s STS, vendar je bila ta veliko nižja od tiste v celicah L929. Najvišjo aktivnost kaspaz smo izmerili po 12 h oz. po 16 h. Po 24 h pa je vidna znižana aktivnost kaspaz, kar je posledica visokega deleža mrtvih celic. Razlike v aktivnosti kaspaz po tretiranju s STS bi lahko bile posledica različne količine izraženih kaspaz v posameznem celičnem modelu. Povečano aktivnost kaspaz smo zaznali tudi v popolnih lizatih celic MEF že po 6 h tretiranja s TC. Med 10 in 16 h je nastal neke vrste plato, kar bi lahko bilo tudi posledica zmanjšanja sinteze proteinov, vključno s proapoptotskimi proteini, zaradi prisotnosti CHX. Ti rezultati so tudi v skladu z deležem mrtvih celic (slika 11) (Mattson in Furukawa, 1997).

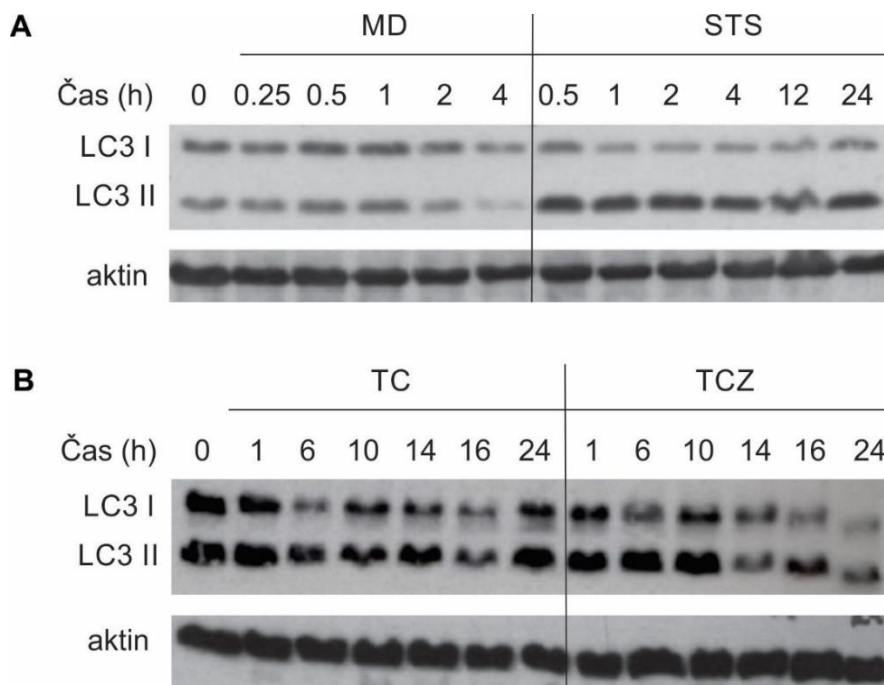


Slika 13: Aktivnost kaspaz v celicah MEF in L929 po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti. A) Celice MEF smo tretirali s 75 μ M MD, 1 μ M STS in TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX). B) Celice L929 pa smo tretirali s 75 μ M MD in 1 μ M STS. Po ustrezno dolgi inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate. Kaspazno aktivnost smo merili fluorimetrično 30 minut na podlagi hidrolize substrata Ac-DEVD-AFC. Rezultati so bili podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice), nato pa normalizirani na kontrolo (v času 0 h). Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

4.1.2 Sprožilci celične smrti vplivajo na avtofagijo

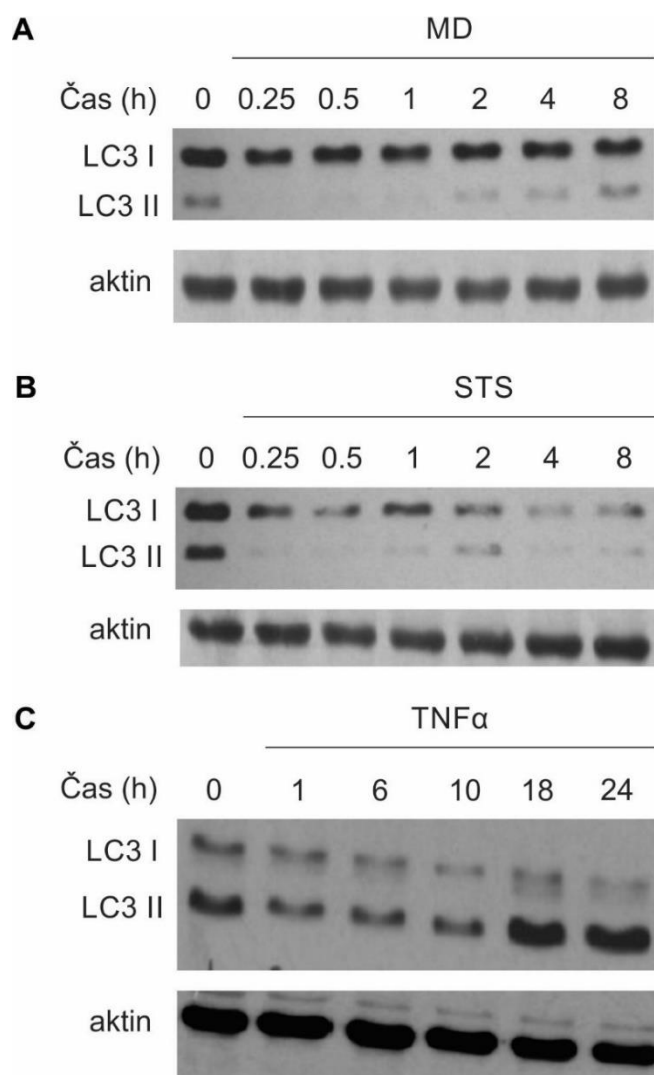
Avtofagija je vključena v številne fiziološke procese, kot so celični metabolizem, preživetje in celična smrt (Shen Han-Ming, 2014). Zato smo v naslednjem koraku preverili, če različni sprožilci celične smrti vplivajo na avtofagijo. Pripravili smo popolne celične lizate in po prenosu western z imunodetekcijo ugotavljali, kaj se dogaja s proteinom LC3, ki je marker za avtofagijo. Raven LC3 II je tudi ena izmed kvantitativnih markerjev za avtofagijo, saj je LC3 potreben za nastanek avtofagosomov, njegova raven pa naj bi bila premo-sorazmerna s količino avtofagosomov v celici (Klionsky in sod., 2012; Redmann in sod., 2017).

S slike 14 je razvidno, da je že bazalna raven avtofagije v celicah MEF razmeroma visoka, saj sta prisotna LC3 I in LC3 II. Po tretiranju z MD (slika 14A) opazimo, da pri 0,5 in 1 h pride do rahlega kopičenja LC3 I, kar je lahko posledica sinteze novih molekul LC3 I. Po 4 h pa je znatno manj LC3 II, kar je verjetno posledica ustavljene sinteze novih proteinov, poleg tega je veliko mrtvih celic. Pri tretiranju s STS pa nismo opazili bistvene razlike v LC3 II, kar bi lahko bilo tudi posledica inhibicije razgradnje avtofagosomov v lizosomih (ang. autophagic flux). Ko pa smo celice tretirali s TNF (slika 14B), smo opazili zmanjšanje LC3 I in delno znižanje LC3II. Na podlagi rezultatov smo sklepali, da avtofagija poteka, vendar je v celicah zaradi inhibirane sinteze proteinov s CHX vedno manj proteina LC3.



Slika 14: Sprememba LC3 na proteinski ravni celic MEF po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti. Celice MEF smo tretirali z različnimi sprožilci celične smrti. Po pretečeni inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate v RIPA pufu. Proteine smo ločili z NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi za protein LC3 in aktin. A) Sprememba LC3 po času po tretiranju s 75 μ M MD in 1 μ M STS. B) Sprememba LC3 po času po tretiranju s TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD).

Poskuse smo ponovili na celicah L929 (slika 15). Ko smo celice tretirali z MD, šele po 2 h opazimo rahlo liso za LC3 II, ki je dobro vidna šele po 8 h (slika 15A). Pri tretiranju s STS pa je prišlo že po 15 min do zmanjšanja LC3 I, medtem ko LC3 II ni bil zaznaven, vendar se je po 2 h začasno ponovno pojavil (slika 15B). Do tega pride, ko so celice izpostavljene stresu za krajši čas. LC3 II je prisoten tako na notranji kot na zunanji membrani avtofagosoma, kjer Atg4 odcepi zunanji LC3 II, ki se vrne v citosol ter se ponovno uporabi. Ko so bile celice izpostavljene stresu daljši čas, pa sta začela tako LC3 I kot LC3 II izginjati. To bi lahko bilo posledica zelo hitrega pretvarjanja iz LC3 I v LC3 II obliko. Pri vzorcih, tretiranih s TNF, je najprej prišlo do znižanja LC3 I in LC3 II, po 18 h pa smo zaznali ogromno LC3 II oblike (slika 15C).



Slika 15: Sprememba LC3 na proteinski ravni celic L929 po tretiranju z različnimi sprožilci celične smrti. Celice L929 smo tretirali z različnimi sprožilci celične smrti. Po pretečeni inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru. Proteine smo ločili z NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi za protein LC3 in aktin. Sprememba LC3 v odvisnosti od časa po tretiranju s A) 75 μM MD; B) 1 μM STS in C) TNF (10 ng/ml).

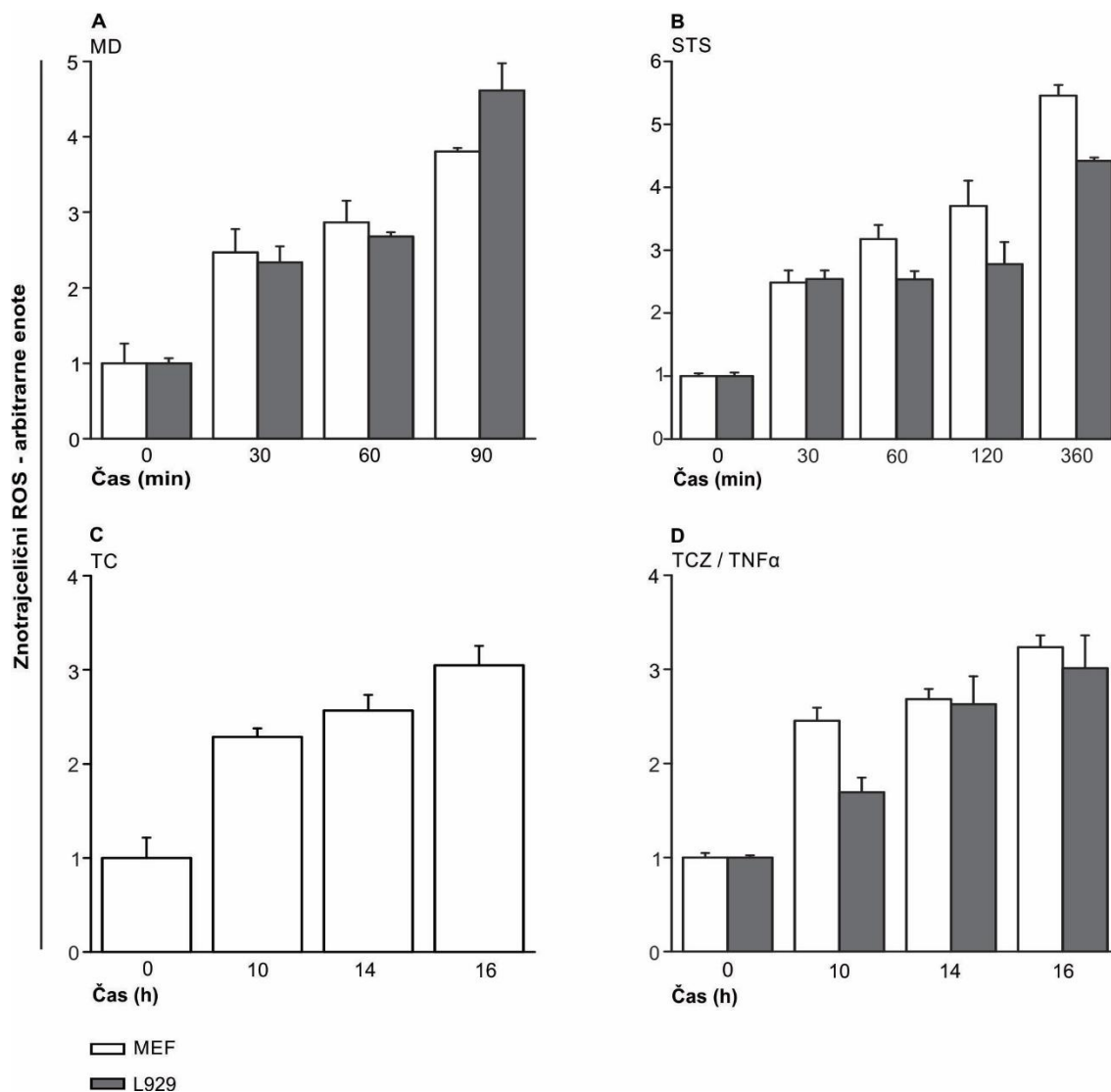
Da bi naše rezultate potrdili, smo poskuse ponovili še v prisotnosti klorokina, ki je splošno znan inhibitor avtofagije. Klorokin se v kislem pH protonira in posledično ostane ujet v lizosomih ter drugih kislih veziklih. Zvišanje pH nato inhibira lizosomsko razgradnjo in zlivanje avtofagosomov z lizosomi ni mogoče (Klionsky in sod., 2012; Redmann in sod., 2017). Ko smo pred uporabo sprožilcev celične smrti dodali klorokin, smo videli, da je ne glede na vrsto sprožilca celične smrti in ne glede na čas tretiranja prišel LC3 I izginjati, LC3 II pa se je dodatno kopičil (rezultati niso prikazani). S tem smo potrdili našo domnevo, da se pri tretiranju z MD, STS in TNF sproži avtofagija, preden začnejo celice umirati (slika 14 in 15).

4.1.3 Sprožilci celične smrti povzročijo nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) imajo pomembno vlogo pri nekrozi, povezava z ostalimi oblikami celične smrti pa še ni popolnoma pojasnjena (Green in Kroemer, 2004). S tem namenom smo najprej preverili nastajanje ROS v odvisnosti od časa in glede na uporabljen sprožilec. Nastanek ROS smo določali s pomočjo reagenta CM-H₂DCFDA, ki zazna nastali vodikov peroksid, in MitoSOX, ki fluorescira v prisotnosti superoksidnih anionov v mitohondrijih.

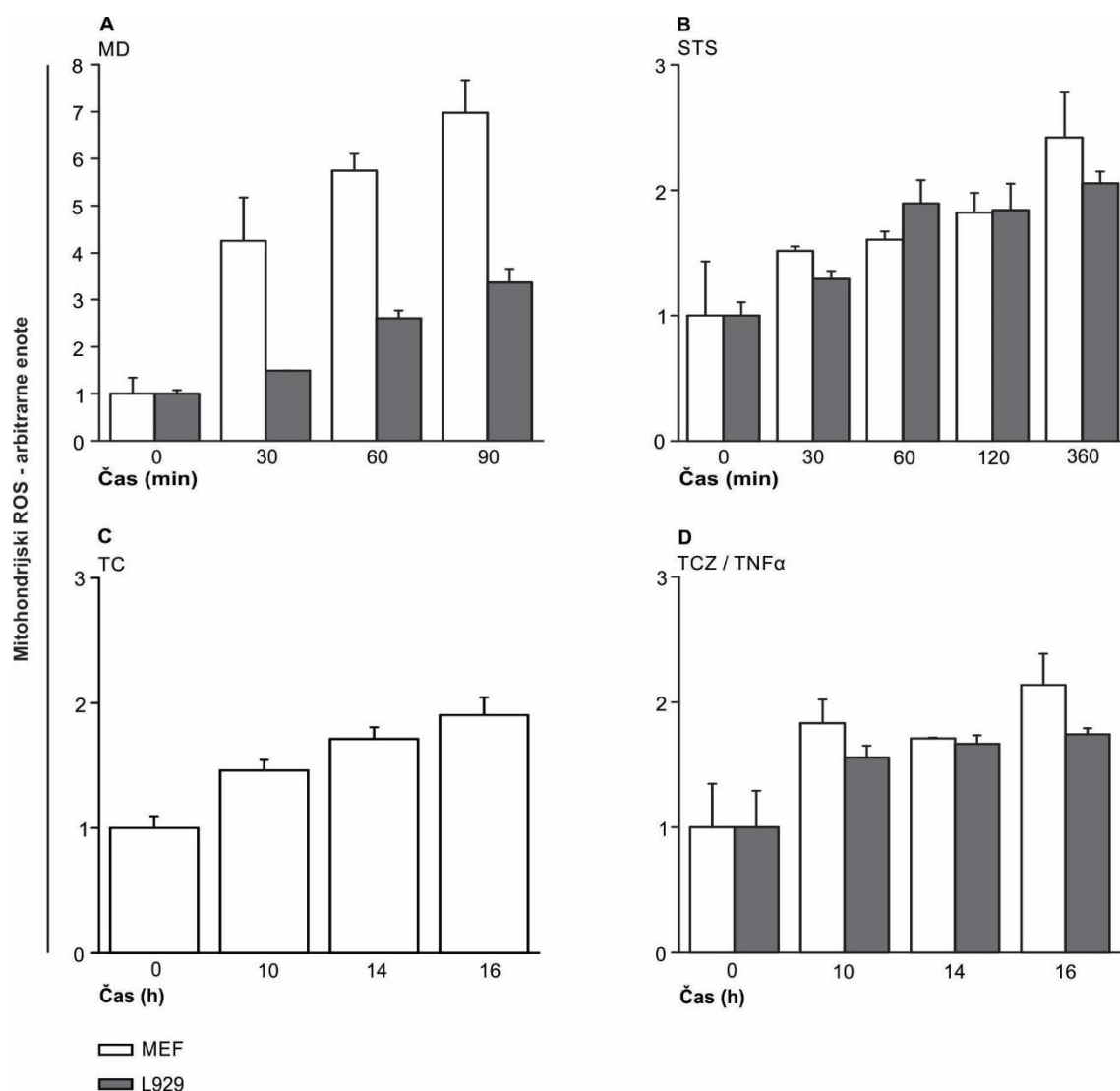
Ugotovili smo, da so vsi sprožilci povzročili naraščanje vodikovega peroksida v odvisnosti od časa. Že 30 min po tretiranju z MD in STS (slika 16A, B) smo opazili porast ROS, medtem ko

je vidna razlika v primerjavi s kontrolo po TNF nastala šele po 10 h (slika 16C, D). Iz grafov je tudi razvidno, da je MD močnejši sprožilec oksidativnega stresa v primerjavi z drugimi. Ugotovili smo tudi, da je vodikov peroksid nastal pred pričetkom umiranja celic, tretiranih z MD ali STS (slika 11A, B; slika 16 A, B). Ko pa smo celice tretirali s TNF, smo opazili, da pride istočasno do porasta oksidativnega stresa in števila mrtvih celic. Na podlagi teh rezultatov smo sklepali, da bi lahko vodikov peroksid kot najbolj razširjena oblika ROS imel pomembno vlogo pri celični smrti, sproženi z MD in STS, vendar ne pri TNF.



Slika 16: Sprožilci celične smrti spodbudijo nastajanje znotrajceličnih ROS, preden začne naraščati odstotek mrtvih celic. Celice MEF in L929 smo tretirali z A) 75 μ M MD, B) 1 μ M STS, C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) oziroma samo TNF (10 ng/ml) v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po tretiranju smo celicam dodali še CM-H₂DCFDA in vzorce pripravili za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

Poškodovani mitohondriji so glavni vir škodljivih mitohondrijskih ROS, ki smo jih določili z uporabo barvila MitoSOX. Ugotovili smo, da je prišlo do povečanja nastajanja mitohondrijskih superoksidnih ionov zlasti po tretiranju z MD, ki vpliva na delovanje mitohondrijske dihalne verige (Baran in sod., 2010) (slika 17A). Pri ostalih sprožilcih celične smrti velikih razlik v primerjavi z netretiranim vzorcem nismo opazili (slika 17B-D). Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da imajo ROS pomembno vlogo pri celični smrti, sproženi z MD, vendar ne pri STS in TNF.



Slika 17: Sprožilci celične smrti lahko spodbudijo nastajanje mitohondrijskih ROS. Celice MEF in L929 smo tretirali z A) 75 μ M MD, B) 1 μ M STS, C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) oziroma samo TNF (10 ng/ml) v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po tretiranju smo celicam dodali še MitoSOX in vzorce pripravili za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

4.1.4 Vpliv antioksidantov na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti

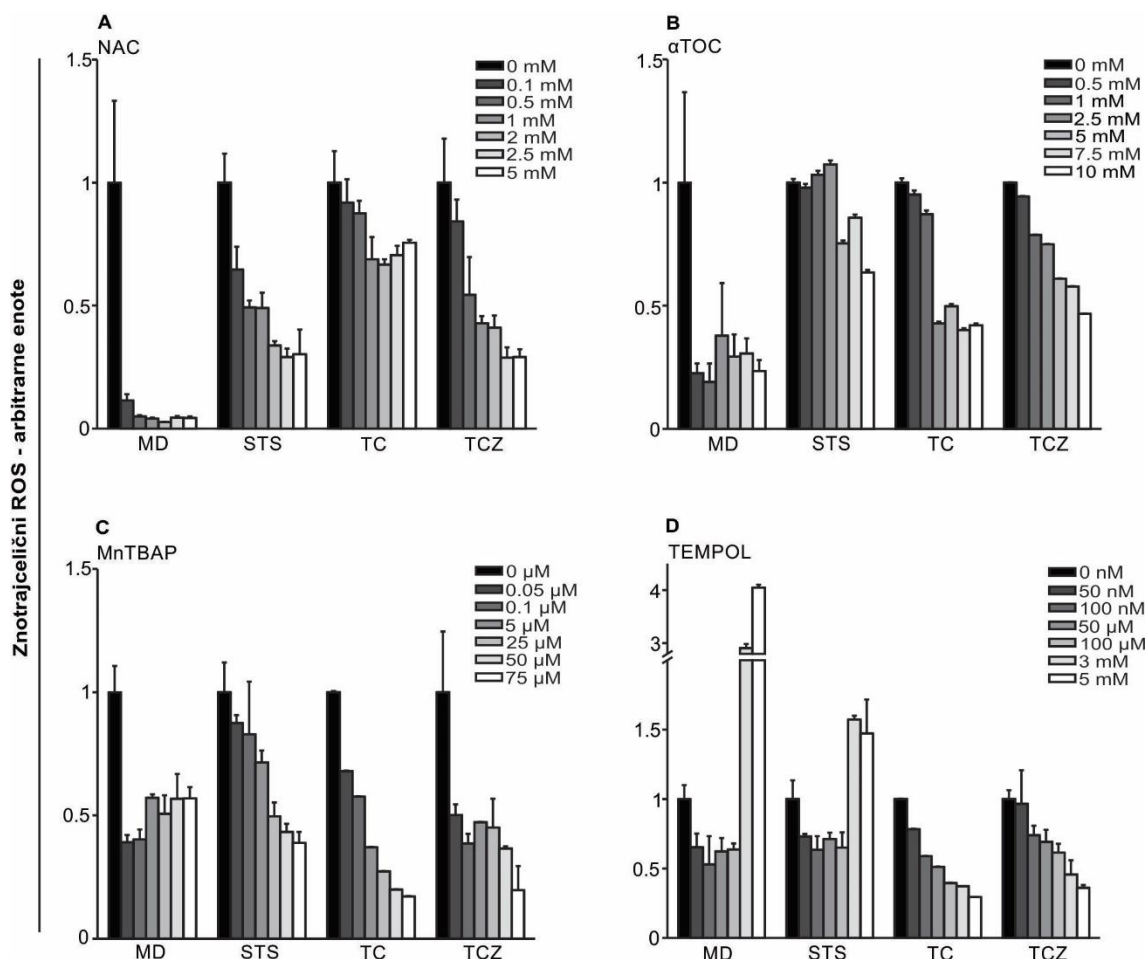
Oksidativni stres se je povečal pri uporabi MD, STS in TNF. Na podlagi rezultatov nastajanja znotrajceličnih ROS (slika 16) smo izbrali časovne točke, v katerih smo hoteli dodatno preveriti vlogo ROS pri različnih oblikah celične smrti. V nadaljnjih poskusih smo uporabili štiri različne lovilce ROS: NAC, α TOC, MnTBAP in Tempol, ki smo jih dodali 2 h pred sprožilci celične smrti.

S slike 18A je razvidno, da je NAC že pri nizkih koncentracijah učinkovito preprečil nastajanje znotrajceličnih ROS, ki so nastali kot posledica tretiranja z MD. Razmeroma učinkovito zaščito je pokazal tudi pri STS in TNF v kombinaciji s CHX in zVAD (TCZ). Pri tretiranju s TNF v kombinaciji s CHX (TC) pa so bile nižje koncentracije NAC neučinkovite, višje koncentracije pa so le delno omejile nastajanje znotrajceličnih ROS.

Lipofilni antioksidant α TOC je pokazal učinkovito zaščito pred MD (slika 18B). Pri nižjih koncentracijah je bil neučinkovit pri preprečevanju nastajanja ROS po tretiranju z drugimi

sprožilci celične smrti, vendar je pri višjih koncentracijah (≥ 5 mM) razmeroma uspešno znižal oksidativni stres.

MnTBAP in Tempol naj bi nevtralizirala nastale znotrajcelične superoksidne ione. MnTBAP je razmeroma učinkovito preprečil nastanek ROS v odvisnosti od koncentracije ne glede na uporabljen sprožilec (slika 18C). Kot je prikazano na sliki 18D, dodatek Tempola nima enotnega učinka. Nizke koncentracije Tempola (≤ 100 μ M) so delno zmanjšale nastanek ROS po tretiranju z MD in STS, višje koncentracije (≥ 3 mM) pa so imele nasprotni učinek. V celicah, tretiranih s TNF v kombinaciji s CHX (TC) in zVAD (TCZ), pa je Tempol znižal ROS v celici.

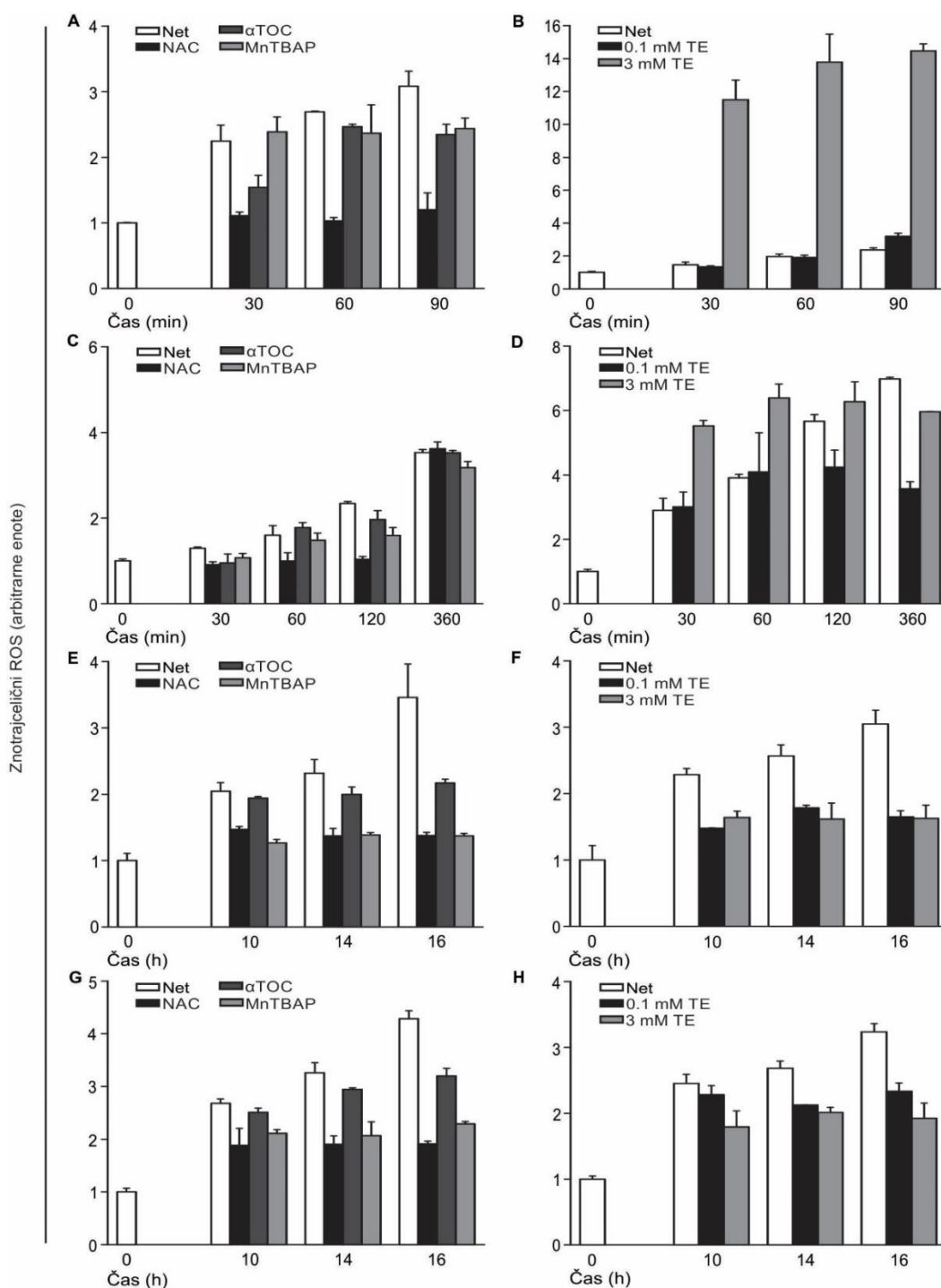


Slika 18: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah MEF. Celice MEF smo tretirali 30 min s 75 μ M MD, 1 μ M STS ali pa 14 h s TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). Antioksidante A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

V naslednjem koraku smo želeli preveriti, ali izbrane koncentracije odstranjevalcev ROS lahko preprečijo nastanek ROS po daljši inkubaciji z MD, STS in TNF v kombinaciji z inhibitorji v celicah MEF.

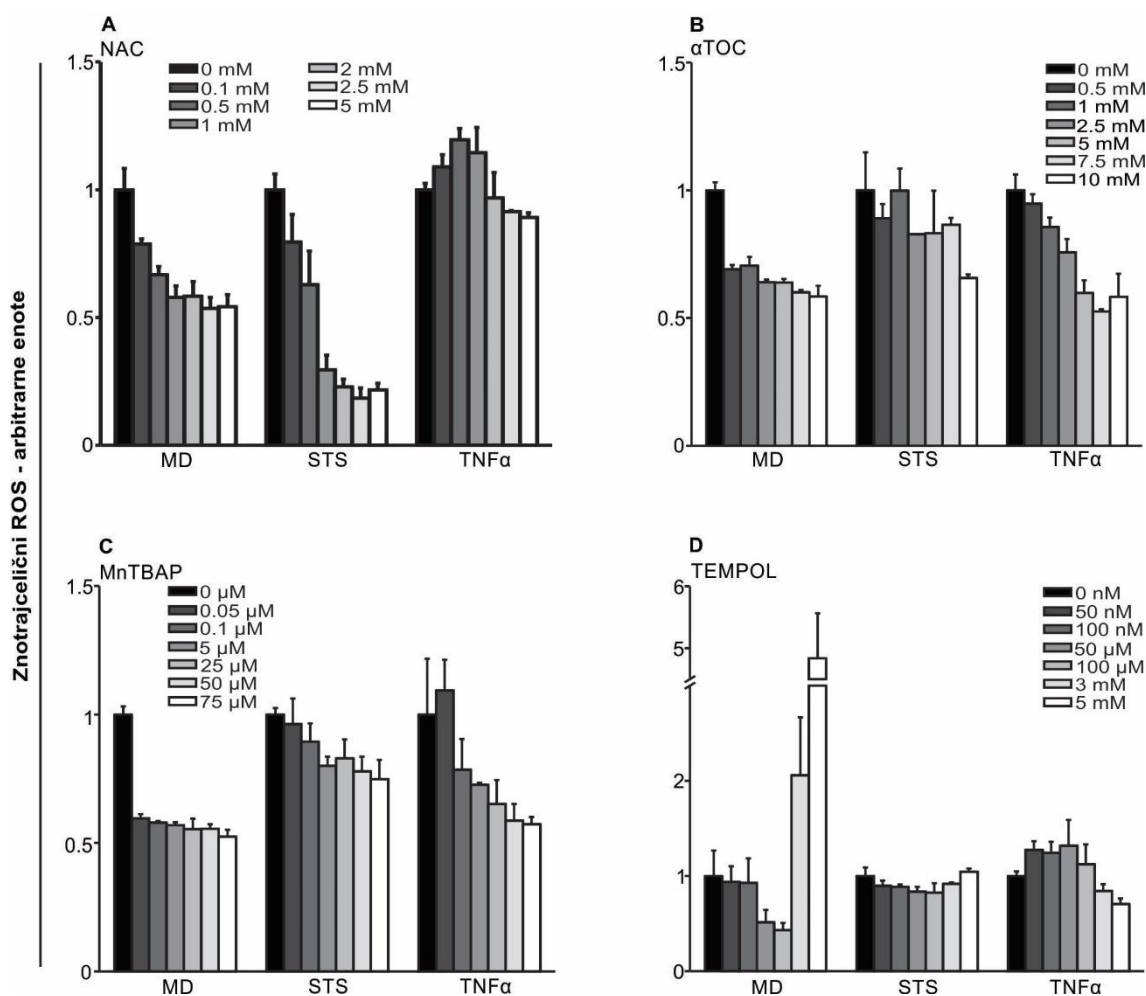
Ugotovili smo, da je NAC edini dolgoročno preprečil oksidativni stres, sprožen z MD. Ostali antioksidanti so bili vedno manj učinkoviti v odvisnosti od časa tretiranja z MD; 3 mM Tempol pa je imel oksidativno delovanje (slika 19A, B). Pri tretiranju z NAC in STS smo najprej potrdili zmanjšanje znotrajceličnih ROS, ki pa so nato ponovno narasli (pri 360 min). α TOC in MnTBAP sta deloma preprečila povišanje znotrajceličnih ROS po 30 min, pri daljših inkubacijah pa nista imela učinka (slika 19C). Visoka koncentracija Tempola skupaj s STS je imela po 30 min izrazito oksidativni vpliv (slika 19D), vendar je po 6 h ostala raven znotrajceličnih ROS razmeroma enaka začetni. Slednje je najverjetneje posledica povišanja celične smrti in odlepljanja celic, kar lahko

privede do lažno negativnih rezultatov. Rezultati nastajanja znotrajceličnih ROS po tretiranju s TNF v kombinaciji z inhibitorji (slika 19E-H) so pokazali, da so izbrane koncentracije antioksidantov preprečile oz. omejile oksidativni stres, z izjemo α TOC, ki je učinkoval najslabše.



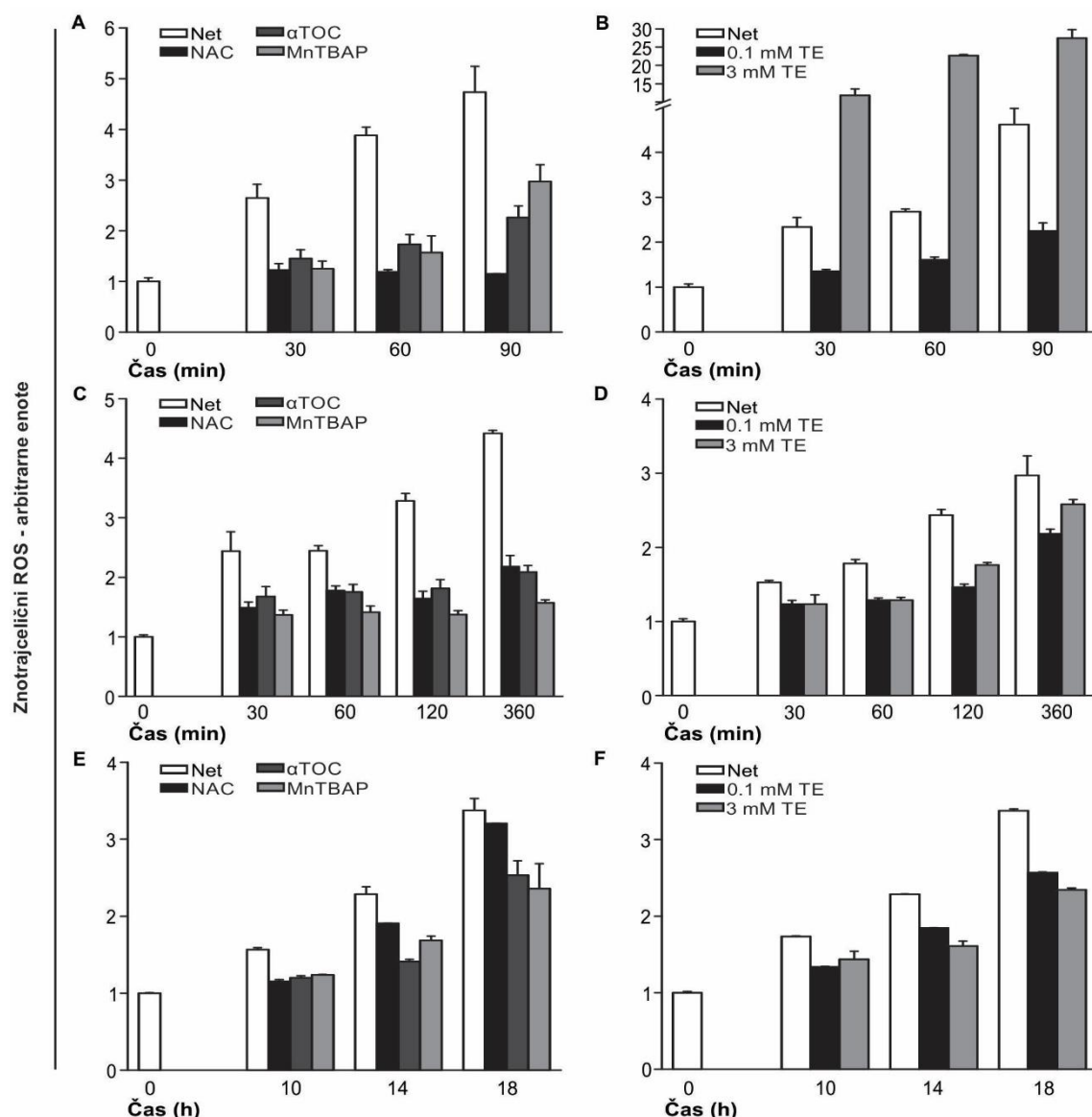
Slika 19: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah MEF v odvisnosti od časa. Antioksidante 1 mM NAC, 5 mM α TOC, 25 μ M MnTBAP in 0,1 oz. 3 mM Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Celice smo nato tretirali različno dolgo z A, B) MD (75 μ M), C, D) STS (1 μ M), E, F) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in G, H) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). Po končnih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

Poskuse smo ponovili še na celicah L929. Kot je prikazano na sliki 20, je dodatek antioksidantov vplival predvsem na znižanje znotrajceličnih ROS po tretiranju z MD, z izjemo visokih koncentracij Tempola (≤ 3 mM), ki so oksidativni stres še povečale. Učinka tretiranja s STS ni bilo mogoče preprečiti z nobenim od testiranih antioksidantov, razen z NAC pri koncentracijah, višjih od 1 mM. Povišanje znotrajceličnih ROS po tretiranju s TNF pa so vsaj deloma preprečili vsi izbrani antioksidanti.



Slika 20: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah L929. Celice L929 smo tretirali 30 min s 75 μ M MD, 1 μ M STS ali pa 18 h s TNF (10 ng/ml TNF). Antioksidante A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescenca za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

Vpliv antioksidantov na oksidativni stres po tretiranju s sprožilci celične smrti smo spremljali tudi po daljši inkubaciji (slika 21). Rezultati so pokazali, da je bil NAC edini antioksidant, ki je preprečil nastajanje znotrajceličnih ROS po daljši izpostavitvi z MD ali STS in deloma TNF. α TOC je delno vplival na oksidativni stres, sprožen z MD ali pa TNF, vendar je precej učinkovito znižal nastajanje znotrajceličnih ROS po tretiranju s STS. Odstranjevalca superoksidnih ionov sta imela različen vpliv, saj je MnTBAP omejil nastajanje ROS po STS tretiranju in delno po MD, Tempol pa je pri višji koncentraciji še povečal nastajanje ROS. Podobno kot v celicah MEF sta tako MnTBAP in Tempol inhibirala ROS, nastale kot posledica izpostavitve TNF.

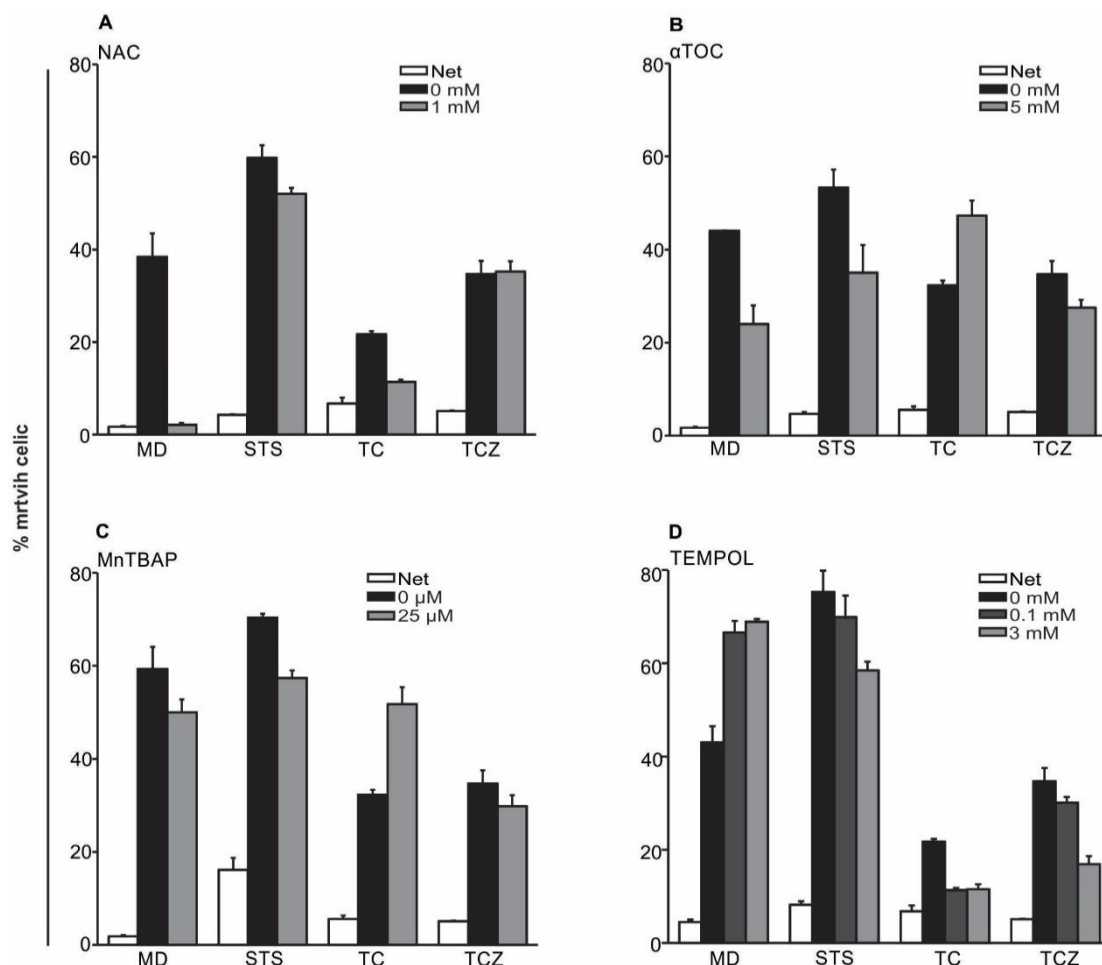


Slika 21: Vpliv izbranih antioksidantov na nastanek ROS v celicah L929 v odvisnosti od časa. Antioksidante 1 mM NAC, 5 mM α TOC, 25 μ M MnTBAP in 0,1 oz. 3 mM Tempol smo dodali 2 h pred sprožilci celične smrti. Celice smo nato tretirali različno dolgo z A, B) MD (75 μ M), C, D) STS (1 μ M), E, F) in TNF (10 ng/ml TNF). Po končanih inkubacijah smo celicam dodali CM-H₂DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje reprezentativen poskus. Stolpci predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

4.1.5 Vpliv antioksidantov na celično smrt

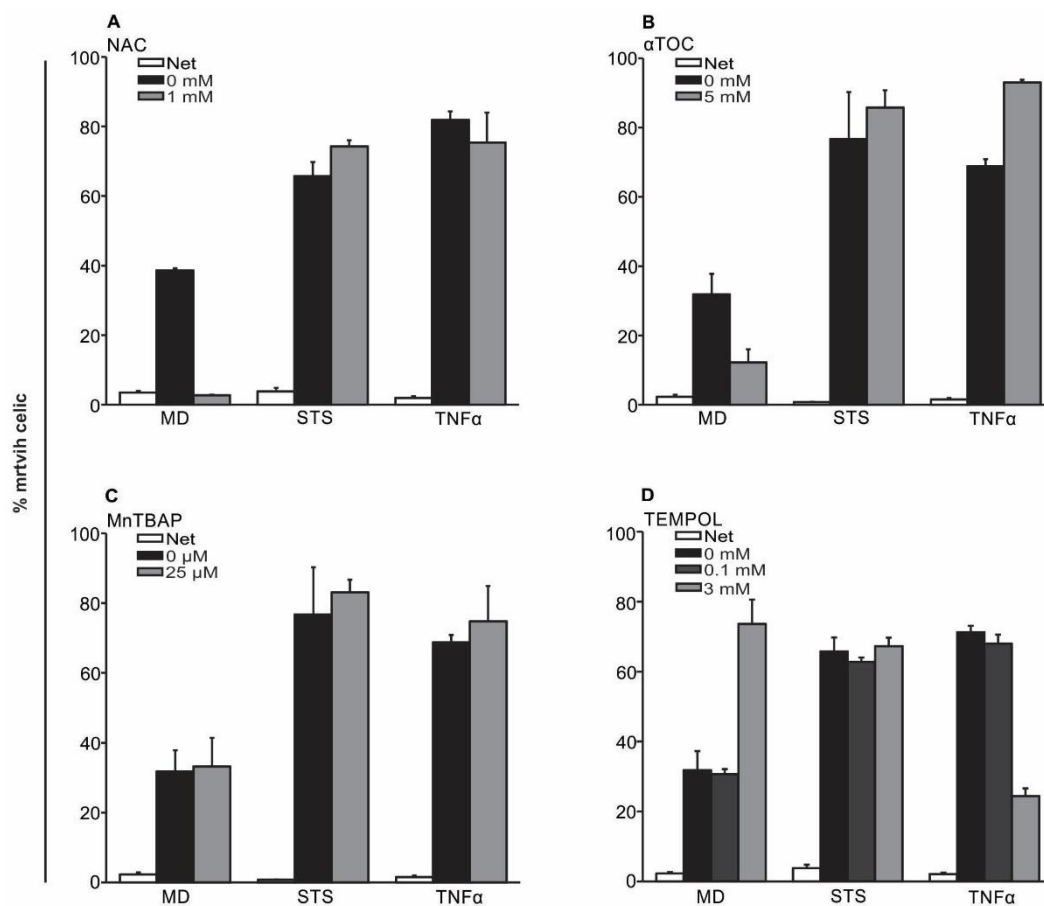
V naslednjem koraku nas je zanimalo, če uporaba antioksidantov vpliva na celično smrt v določenih časovnih točkah (slika 22). Da bi se prepričali, ali je znižanje znotrajceličnih ROS zadostno za preprečitev celične smrti, smo uporabili izbrane koncentracije antioksidantov (1 mM NAC; 5 mM α TOC, 25 μ M MnTBAP in 0,1 oz. 3 mM Tempol). NAC je bil najbolj učinkovit antioksidant, ki je popolnoma preprečil z MD sproženo nekrozo, vendar je lahko le delno vplival na znižanje celične smrti po inkubaciji s STS in TNF (slika 22A). α TOC je lahko delno preprečil umiranje celic po tretiranju z MD, vendar je bil manj učinkovit pri drugih oblikah celične smrti (slika 22B). MnTBAP pa je bil med uporabljenimi antioksidanti najmanj učinkovit, saj ni bilo opaznega znižanja odstotka mrtvih celic v primerjavi s pozitivno kontrolo (slika 22C). Pri uporabi Tempola smo ponovno dobili nasprotujoče si rezultate (slika 22D). Tempol je pokazal učinkovito

zaščito pred celično smrtjo, sproženo s TNF, vendar je bil v kombinaciji z MD ali pa STS za celice MEF toksičen.



Slika 22: Vpliv antioksidantov na celično smrt v celicah MEF. Izbrane koncentracije antioksidantov A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožitvi celične smrti. Celice MEF smo tretirali 4 h s 75 μ M MD, 24 h z 1 μ M STS ali pa 14 h s TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD). Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice so definirane kot aneksinV-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

Pri celicah L929 smo pri spremljanju vpliva antioksidantov na celično smrt dobili podobne rezultate kot pri celicah MEF. Ugotovili smo, da je imel NAC edini pozitiven učinek v primeru MD (slika 23A) in α TOC je deloma povečal preživetje celic (slika 23B), medtem ko ostali antioksidanti niso imeli nobenega vpliva (zlasti razvidno pri tretiranju z MnTBAP na sliki 23C). Tempol je v visokih koncentracijah po tretiranju z MD (slika 23D) še dodatno povečal odstotek mrtvih celic. Po 18-urni inkubaciji s Tempolom in TNF pa smo opazili, da pride do skoraj 50 % znižanja mrtvih celic v primerjavi z vzorcem samo z dodanim TNF.



Slika 23: Vpliv antioksidantov na celično smrt v celicah L929. Izbrane koncentracije antioksidantov A) NAC, B) α TOC, C) MnTBAP in D) Tempol smo dodali 2 h pred sprožitvi celične smrti. Celice L929 smo tretirali 4 h s 75 μ M MD, 24 h z 1 μ M STS ali pa 18 h z 10 ng/ml TNF. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice so definirane kot aneksin V-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

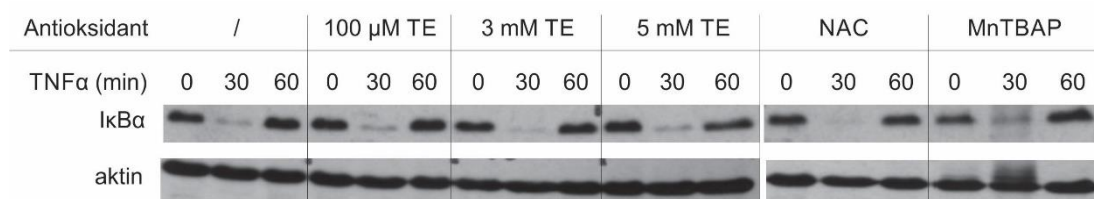
Da bi preverili, če imajo antioksidanti tudi dolgotrajno zaščito, smo spremljali preživetje celic MEF in L929 tudi v kasnejših časovnih točkah (rezultati niso prikazani). Ugotovili smo, da je NAC edini preprečil celično smrt po tretiranju z MD, višja koncentracija Tempola pa je pozitivno vplivala na viabilnost po tretiranju s TNF. Pri uporabi ostalih odstranjevalcev ROS pa smo opazili, da se odstotek celične smrti kljub vsemu poveča po daljšem tretiranju. Na podlagi rezultatov smo sklepali, da so antioksidanti celično smrt zgolj upočasnili. ROS najverjetneje nimajo ključne vloge pri celični smrti, sproženi s STS in TNF, in delujejo kot ojačitvena zanka celične smrti. Glede na rezultate smo sklepali, da imajo ROS ključno vlogo samo pri nekrozi, sproženi z MD.

4.1.6 Vpliv antioksidantov na TNF sproženo preživetveno pot

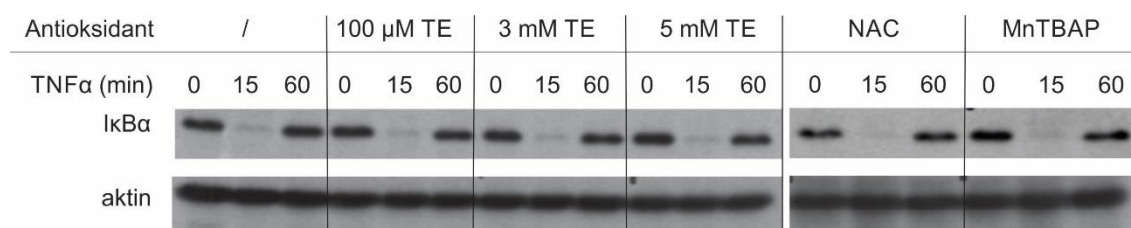
Zanimal nas je tudi vpliv antioksidantov na sprožitev preživetvene poti po tretiranju s TNF v popolnih celičnih lizatih. Glede na predhodne poskuse smo se odločili spremljati preživetveno pot po 30 in 60 min (slika 24). Po 30-minutni inkubaciji s TNF namreč pride do razgradnje $I\kappa\beta$, po 60-minutni inkubaciji pa se ponovno pojavi, saj gre za negativno povratno zanko med $NF\kappa\beta$ in inhibitorjem $I\kappa\beta$.

V treh časovnih točkah (0, 30 in 60 min) smo spremljali tudi vpliv antioksidantov na aktivacijo preživetvene poti (slika 24). Ugotovili smo, da nobeden od uporabljenih antioksidantov ni sprožil preživetvene poti. Poleg tega nismo opazili bistvenih razlik pri razgradnji inhibitorja $I\kappa\beta$ po 30-minutni inkubaciji s TNF. Prav tako se je ponovno enakomerno nakopičil po 60 min.

Na sliki 25 so prikazani rezultati imunocitokemije vzorcev celic L929. Prav tako kot v celicah MEF (slika 24) antioksidanti niso vplivali na potek preživetvene poti, sprožene s TNF, saj nismo uspeli zaznati razlik v prisotnosti inhibitorja $I\kappa\beta$ v posameznih časovnih točkah.



Slika 24: Prisotnost I κ B α v celicah MEF po tretiranju z antioksidanti in TNF. Celice MEF smo najprej tretirali z antioksidanti (100 μ M Tempol, 3 mM Tempol, 5 mM Tempol, 1 mM NAC in 25 μ M MnTBAP) in 2 h zatem dodali še TNF (100 ng/ml). Po ustrezno dolgi inkubaciji smo pripravili popolne lizate, nato pa smo naredili NaDS PAGE, prenos po westernu in imunodetekcijo I κ B α in aktina.

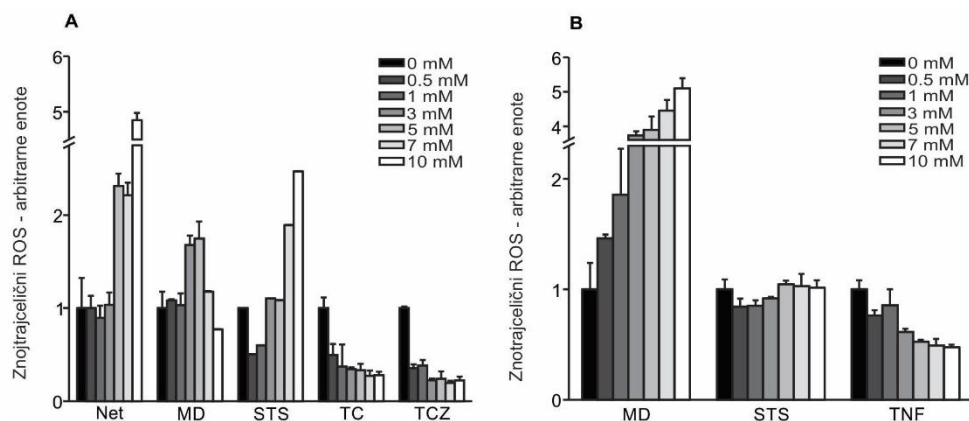


Slika 25: Prisotnost I κ B α v celicah L929 po tretiranju z antioksidanti in TNF. Celice L929 smo najprej tretirali z antioksidanti (100 μ M Tempol, 3 mM Tempol, 5 mM Tempol, 1 mM NAC in 25 μ M MnTBAP) in 2 h zatem dodali še TNF (10 ng/ml). Po ustrezno dolgi inkubaciji smo pripravili popolne lizate, nato pa smo naredili NaDS PAGE, prenos po westernu in imunodetekcijo I κ B α in aktina.

4.1.7 Ne-antioksidativno delovanje Tempola

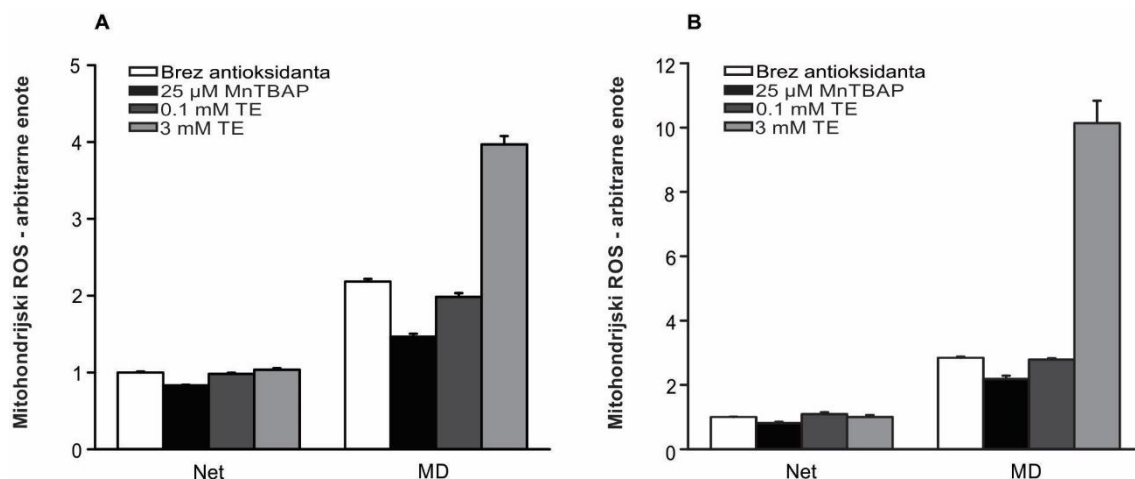
Kot je bilo do sedaj pokazano, ima Tempol nenavaden vpliv na celično smrt v odvisnosti od sprožilca in uporabljene koncentracije. V naslednjem koraku nas je zanimalo, kako visoke koncentracije Tempola vplivajo na nastanek znotrajceličnih ROS.

Naravni in sintetični SOD mimetiki naj bi imeli zvonasto krivuljo pri testiranju vpliva na oksidativni stres. To pomeni, da nizke koncentracije nevtralizirajo nastale superoksidne molekule, vendar pri visokih koncentracijah izgubijo antioksidativno delovanje (Bourassa MG, 2006; Offer in sod., 2000). Ugotovili smo, da Tempol že sam po sebi poviša nastajanje ROS v celicah MEF v koncentracijah, višjih od 3 mM. Ko smo dodali Tempol v kombinaciji z MD, smo opazili, da je z višanjem koncentracije Tempola naraščal tudi oksidativni stres (slika 26A). Dobljeno zvonasto krivuljo v odvisnosti od uporabljene koncentracije bi lahko razložili na podlagi splošnega delovanja SOD oponašalcev (Offer in sod., 2000). Pri tretiranju s STS pa opazimo zgolj naraščanje koncentracije ROS v odvisnosti od uporabljene koncentracije. Kljub vsemu pa nismo dobili pričakovane zvonaste krivulje pri tretiranju s TNF, saj je Tempol znižal raven znotrajceličnih ROS v odvisnosti od koncentracije, kar je bilo veliko bolj izrazito pri celicah MEF kot pri L929 (slika 26B).



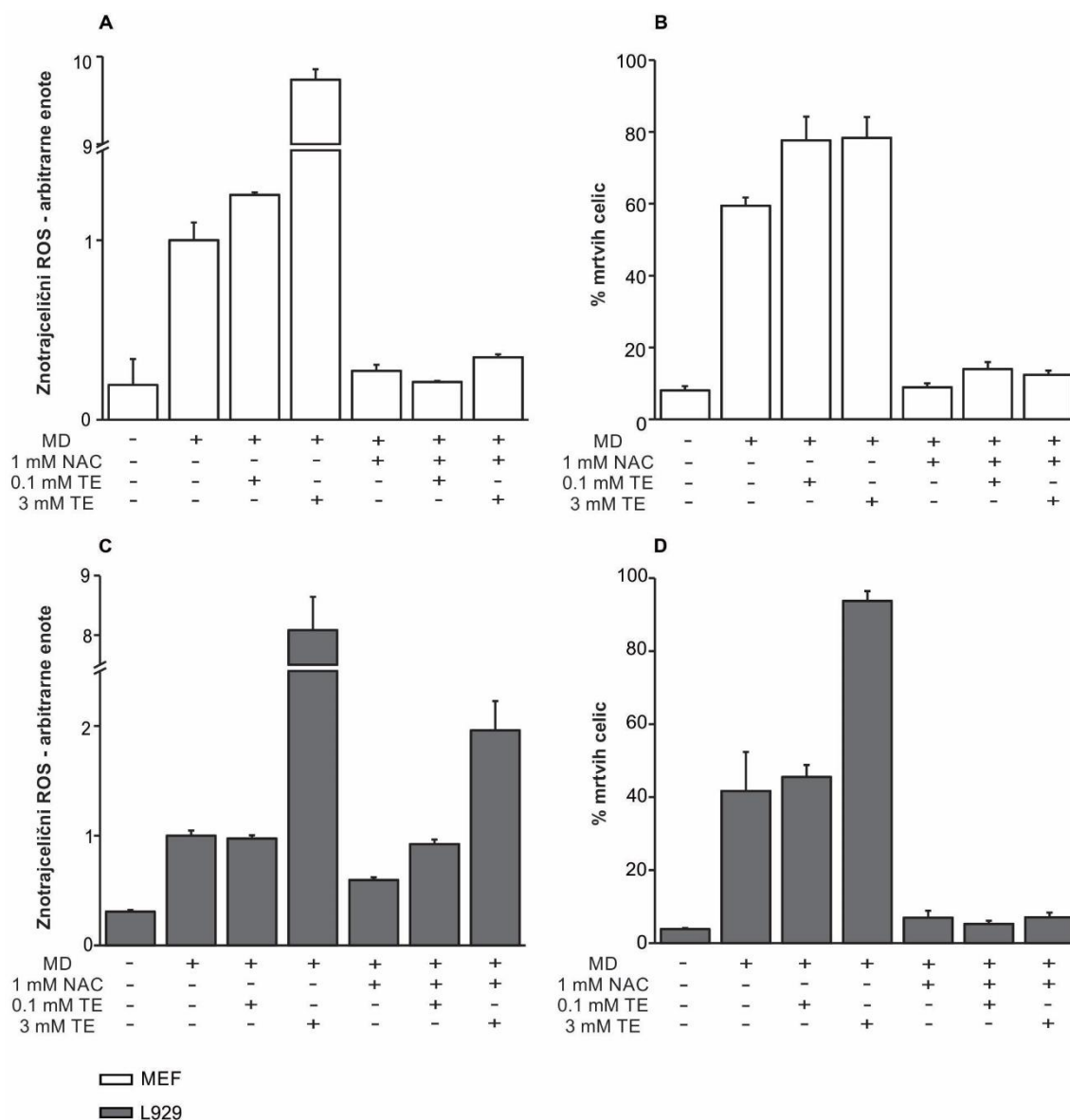
Slika 26: Visoke koncentracije Tempola imajo oksidativni učinek. Celice A) MEF in B) L929 smo 2 h predtretirali s Tempolom, nato pa smo dodali še sprožilce celične smrti: 75 μ M MD za 30 minut, 1 μ M STS za 30 minut, TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) in TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD) za 14 h oziroma samo TNF (10 ng/ml) za 18 h v primeru L929. Pankaspazni inhibitor zVAD smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem s TNF. Po inkubaciji smo celicam dodali CM-H2DCFDA ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati so predstavljeni v arbitrarnih enotah. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

Ker sta MnTBAP ter Tempol SOD oponašalca in naj bi nevtralizirala mitohondrijske ROS, smo naredili primerjavo njunega učinka po tretiranju z MD, ki edini med uporabljenimi sprožilci izrazito vpliva na nastanek mitohondrijskih ROS (slika 17). Iz rezultatov je razvidno (slika 27), da je po tretiranju z MnTBAP intenziteta fluorescence nekoliko upadla v primerjavi z MD tretiranimi vzorci. Nizke koncentracije Tempola niso imele nobenega vpliva na mitohondrijske ROS, visoke koncentracije pa so povzročile njihov porast.



Slika 27: Vpliv MnTBAP in Tempola na nastanek mitohondrijskih ROS. Celice A) MEF in B) L929 smo tretirali 30 min 75 μ M MD. Antioksidanta MnTBAP in Tempol smo dodali 2 h pred dodatkom MD. Po končani inkubaciji smo celicam dodali MitoSOX in vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran.

Celicam MEF in L929 smo poleg Tempola dodali še NAC, da bi ugotovili, ali lahko slednji zaščiti celice pred delovanjem Tempola. Kot je razvidno iz slike 28A in B, NAC učinkovito prepreči nastajanje znotrajceličnih ROS ter celično umiranje po dodatku Tempola in MD celicam MEF. Ko pa so bile celice L929 izpostavljene enakim pogojem, je NAC manj učinkovito nevtraliziral nastajanje ROS, vendar je kljub temu viabilnost celic ostala enaka netretirani kontroli (slika 28C, D). S tem smo potrdili, da NAC najbolj učinkovito prepreči celično smrt, ki je posledica oksidativnega stresa.



Slika 28: NAC inhibira vpliv Tempola na nastajanje znotrajceličnih ROS in celično smrt. A) Vpliv NAC na znižanje nastajanja znotrajceličnih ROS, ki ga sprožita Tempol (TE) in 75 μ M MD (30 min inkubacija) v celicah MEF. B) Vpliv NAC na celično smrt, ki jo sprožita Tempol (TE) in 75 μ M MD (4 h inkubacija) v celicah MEF. Enak učinek na C) nastajanje ROS in D) celično smrt smo opazili pri celicah L929. Antioksidante smo dodali 2 h pred MD. Za spremljanje nastajanja znotrajceličnih ROS smo po končanih inkubacijah celicam dodali CM-H2DCFDA in pripravili vzorce za analizo s pretočnim citometrom. Kot rezultat smo upoštevali geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunali na arbitrarne enote. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom (PI) ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Mrtve celice pa so definirane kot aneksinV-PE in/ali PI pozitivne. Slika prikazuje en reprezentativen poskus. Stolpci prikazujejo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

Nekateri preliminarni rezultati (ni prikazano) nakazujejo, da Tempol prepreči aktivacijo kaspaze 3 in kaspaze 8 ter cepitev proteina Bid v tBid. Zato lahko sklepamo na podlagi tega in dosedanjih rezultatov, da Tempol ne deluje zgolj kot antioksidant, ampak ima morebiti še vpliv na začetne stopnje signalizacije v prisotnosti TNF.

4.2 Analiza mehanizma delovanja lizosomotropičnega detergenta LLOMe

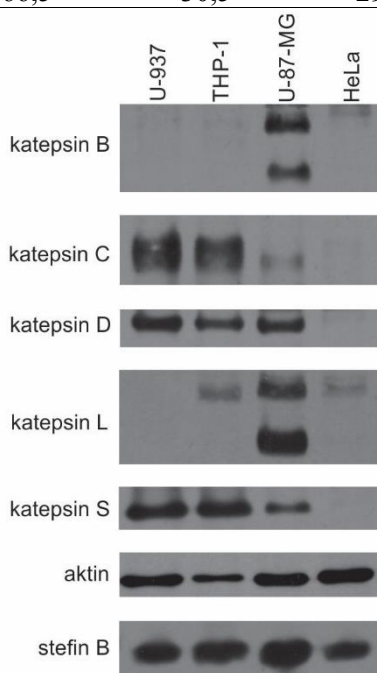
4.2.1 Določitev prisotnosti katepsinov in stefina B v različnih celičnih linijah

V drugem delu doktorske naloge smo želeli pojasniti mehanizem delovanja LLOMe. Za proučevanje poteka celične smrti, sprožene z omenjenim lizosomotropikom, smo prvotno izbrali štiri stabilne celične linije, ki se med seboj razlikujejo v deležu katepsinov tako na RNK kot proteinski ravni (tabela 7, slika 29).

Ker imajo celice HeLa na splošno zelo malo katepsinov, smo jih izločili iz nadaljnjih poskusov. Za kontroliranje nanosa proteinov smo spremljali aktin in stefin B, ki pa se med posameznimi linijami razlikujeta.

Tabela 7: Prisotnost katepsinov in stefina B v celičnih linijah THP-1, U-937, U-87-MG in HeLa. Podatki prikazujejo vrednosti RNA sekveniranja celičnih linij, ki so bile objavljene v Human Protein Atlas 13. 9. 2016.

Protein	Celične linije			
	U-937	THP-1	U-87-MG	HeLa
Katepsin C	355,1	99,5	55,6	35,2
Katepsin B	97,3	65,2	1179,7	156,4
Katepsin D	410,8	192,1	1020,8	99,2
Katepsin L	0	53,4	582,3	74
Katepsin S	41,2	67,2	38,9	0
Stefin B	66,5	30,5	297,4	50,2



Slika 29: Prenos po westernu in imunodetekcija različnih katepsinov v popolnih celičnih lizatih celic THP-1, U-937, U-87-MG in HeLa. Celice smo gojili na ploščah s premerom 10 cm in nato pripravili popolne celične lizate v RIPA pufru. Proteine smo ločili na NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi za katepsine B, C, D, L in S ter GAPDH, aktin in stefin B.

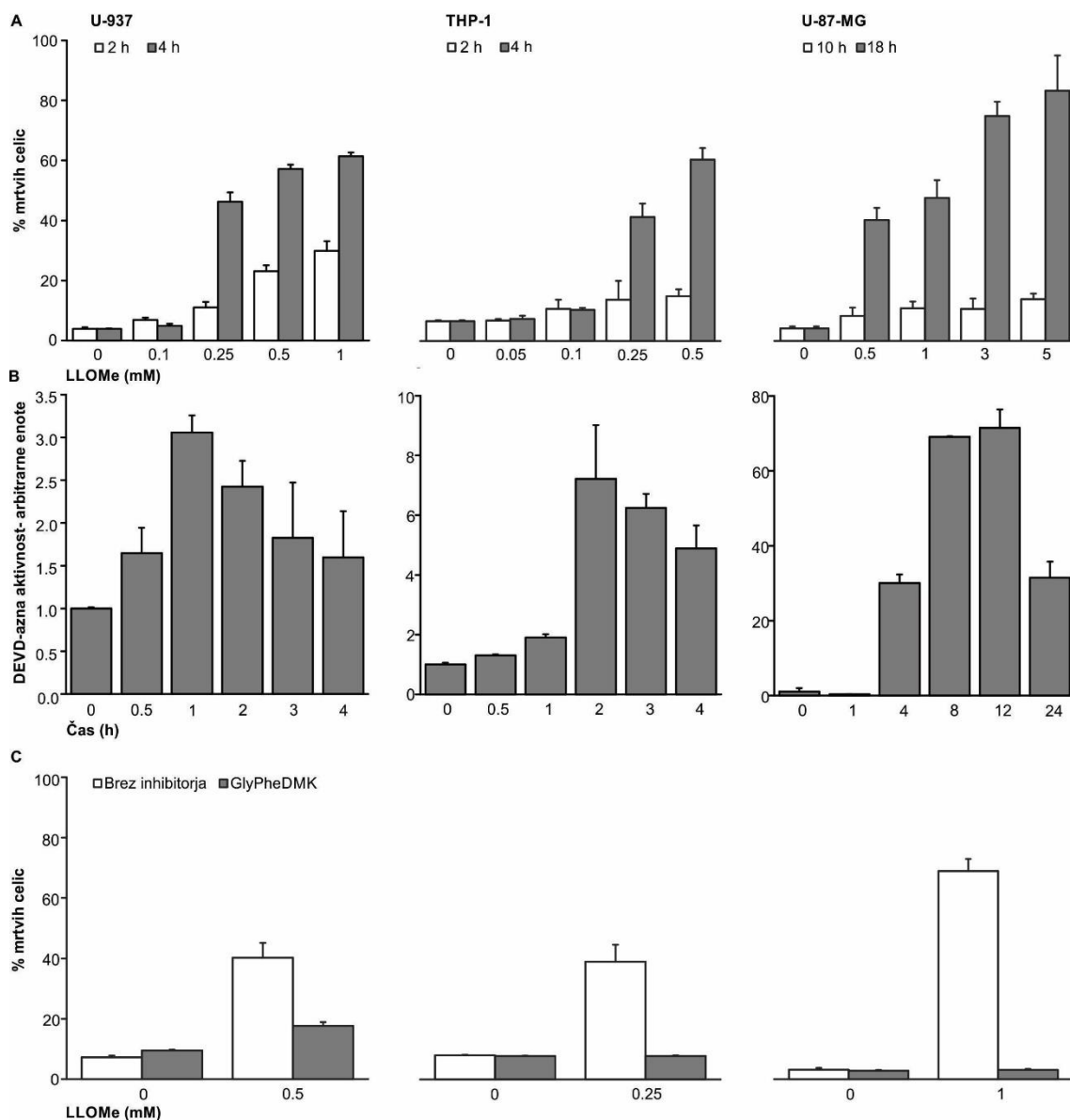
4.2.2 Sprožitev celične smrti z LLOMe

Celice U-937, THP-1 in U-87-MG smo ustrezno dolgo inkubirali v prisotnosti LLOMe (slika 30). Po inkubaciji smo del vzorcev pobarvali z aneksinV-PE in PI ter jih analizirali s pretočnim citometrom, iz preostalih vzorcev pa smo pripravili popolne celične lizate in izmerili DEVD-azno aktivnost.

Iz rezultatov na sliki 30A je razvidno, da že 0,25 mM oz. 0,5 mM LLOMe po 4-urni inkubaciji sproži celično smrt v celicah U-937 in THP-1. Celice U-937 in THP-1 so bile precej bolj občutljive na LLOMe, saj je bilo pri 0,5 mM LLOMe po 10 h živih še 90 % celic U-87-MG. V celicah U-87-MG smo celično smrt sprožili z 0,5 mM LLOMe šele po 18 h. Glede na te rezultate smo v nadaljnjih poskusih uporabili 0,5 mM LLOMe za celice U-937, 0,25 mM LLOMe za celice THP-1 in 1 mM LLOMe za celice U-87-MG.

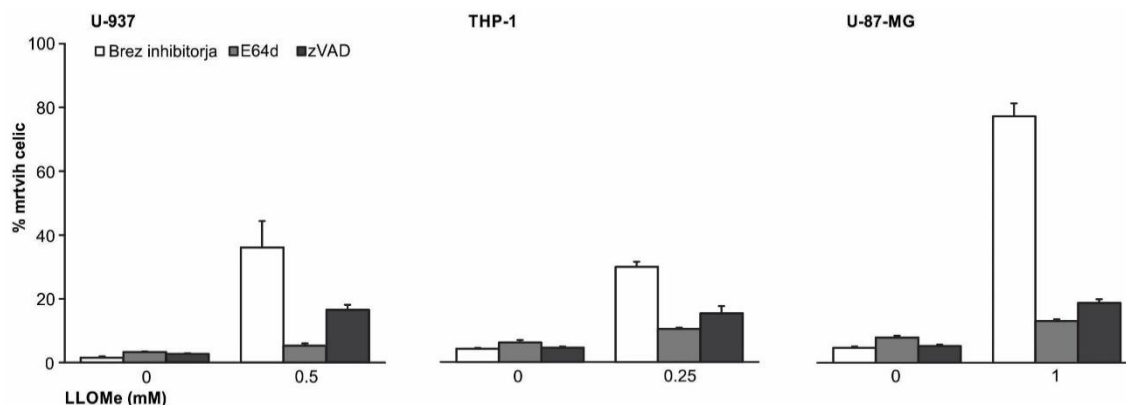
Preverili smo, kdaj in če sploh pride do aktivacije kaspaz, kar smo merili na osnovi hidrolize substrata Ac-DEVD-AFC v popolnih celičnih lizatih, pripravljenih po različno dolgih inkubacijah z LLOMe. Iz rezultatov, zbranih na sliki 30B, razberemo, da so se v celicah U-937 kaspaze aktivirale že po 30 min, najvišjo aktivnost pa smo zaznali po 1 h inkubacije z 0,5 mM LLOMe. V primeru celic THP-1, tretiranih z 0,25 mM LLOMe, je aktivnost nekoliko višja in maksimum doseže po 2-urni inkubaciji. V celicah U-87-MG so se sprožile kaspaze kasneje kot pri ostalih dveh celičnih linijah. Naraščanje aktivnosti smo zaznali po 4 urah, najvišjo aktivnost pa smo izmerili med 8 in 12 h inkubacije. LLOMe je najvišjo DEVD-azno aktivnost sprožil v celicah U-87-MG. To pa najverjetneje ni posledica različnih količin izraženih kaspaz v posameznih celičnih linijah, saj imajo uporabljene celice primerljivo raven izražanja RNA za kaspazo 3 (U-937 imajo 29,9; THP-1 24,0 in U-87-MG 33,5; vir: Protein Atlas; 23. 5. 2018). Na podlagi rezultatov smo tako sklepali, da LLOMe sproži od kaspaz odvisno celično smrt. Ker pa je aktivacija kaspaz zgodnji dogodek, je po daljših časih inkubacije in s povečevanjem deleža mrtvih celic začela kaspazna aktivnost postopoma upadati.

Katepsin C opisujejo kot ključni dejavnik v celični smrti, sproženi z LLOMe (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008; Thiele in Lipsky, 1990). Zato smo celice tretirali tudi z GlyPheDMK, specifičnim inhibitorjem za katepsin C, ki smo ga v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem z LLOMe. S slike 30C vidimo, da je GlyPheDMK učinkovito preprečil celično smrt po dodatku LLOMe v vseh uporabljenih modelih.



Slika 30: Celična smrt po inkubaciji z LLOMe. Celice U-937, THP-1 in U-87-MG smo inkubirali z različnimi koncentracijami LLOMe. A) Po ustrezno dolgi inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slika prikazuje reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Celice U-937 (0,5 mM LLOMe), THP-1 (0,25 mM LLOMe) in U-87-MG (1 mM LLOMe) smo inkubirali različno dolgo. Po končani inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate. Kaspazno aktivnost smo merili fluorimetrično s hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC (10 μ M). Rezultati so bili podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice), nato pa normalizirani na kontrolo (v času 0 h). Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. C) Celice smo 2 h predtretirali z 10 μ M GlyPheDMK, nato pa smo dodali 0,5 mM LLOMe celicam U-937 za 4 h, 0,25 mM LLOMe celicam THP-1 za 4 h in 1 mM LLOMe celicam U-87-MG za 18 h. Vzorce smo pripravili kot na sliki 30A).

V naslednjem koraku nas je zanimalo, ali bi z dodajanjem splošnega inhibitorja cisteinskih katepsinov E64d in pankaspaznega inhibitorja zVAD prav tako opazili zaščitni učinek. Celicam smo ju dodali 2 h pred LLOMe in nato spremljali vpliv na celično preživetje (slika 31). Ugotovili smo, da sta tako E64d kot zVAD izboljšala preživetje celic po inkubaciji z LLOMe, na podlagi česar smo sklepali, da imajo cisteinske proteaze in kaspaze pomembno vlogo pri celični smrti.

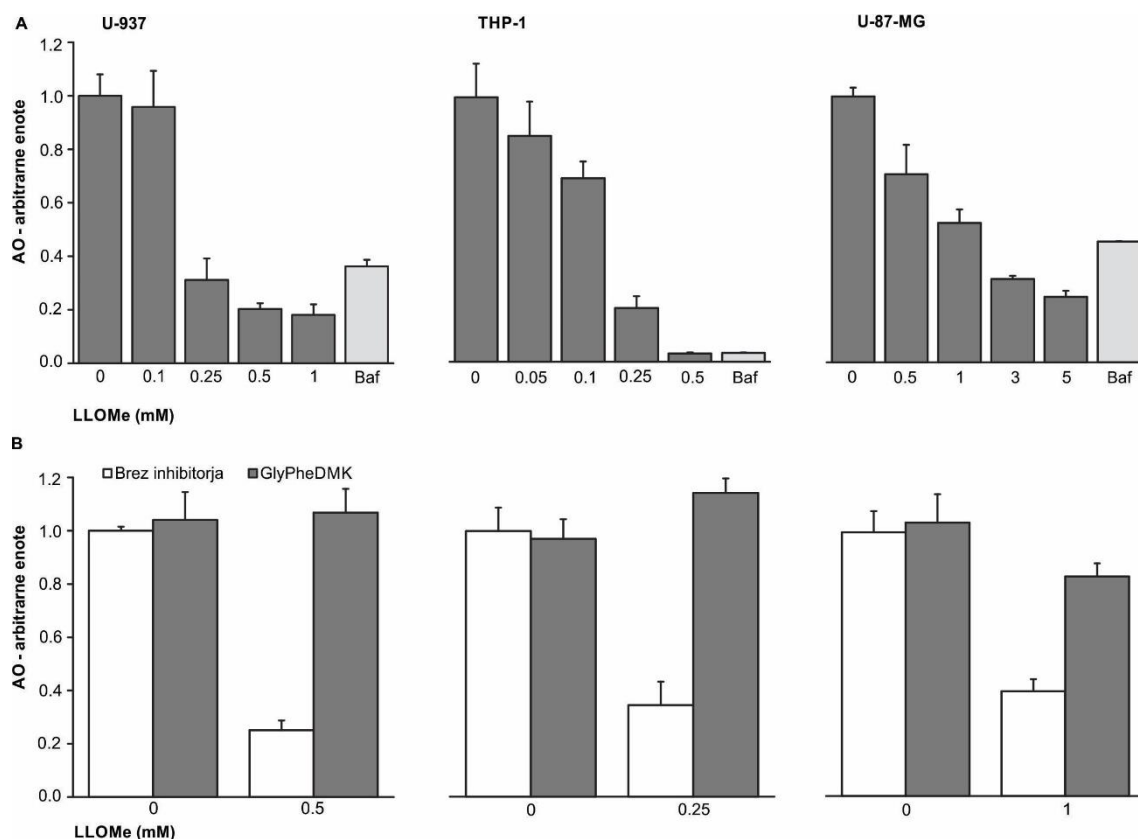


Slika 31: Vpliv E64d in zVAD na celično smrt, sproženo z LLOMe. Celice smo inkubirali z E64d (20 μ M) ali pa zVAD (10 μ M) 2 h. Nato smo dodali ustrezne količine LLOMe za 4 h celicam U-937 in THP-1 ter za 18 h celicam U-87-MG. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinomV-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

4.2.3 LLOMe vpliva na lizosome

Želeli smo potrditi vpliv LLOMe na lizosome, zato smo celice najprej analizirali s pomočjo barvila akridin oranž, ki se kopiči v kislih veziklih. Rezultati so pokazali, da intenziteta fluorescence pada premo sorazmerno z naraščanjem koncentracije LLOMe. Pri celicah U-937 in THP-1 pride do zmanjšanja privzemanja barvila po 30-minutni inkubaciji z 0,25 mM LLOMe, pri celicah U-87-MG pa je bila za enak učinek potrebna višja koncentracija (1 mM ali višja) (slika 32A).

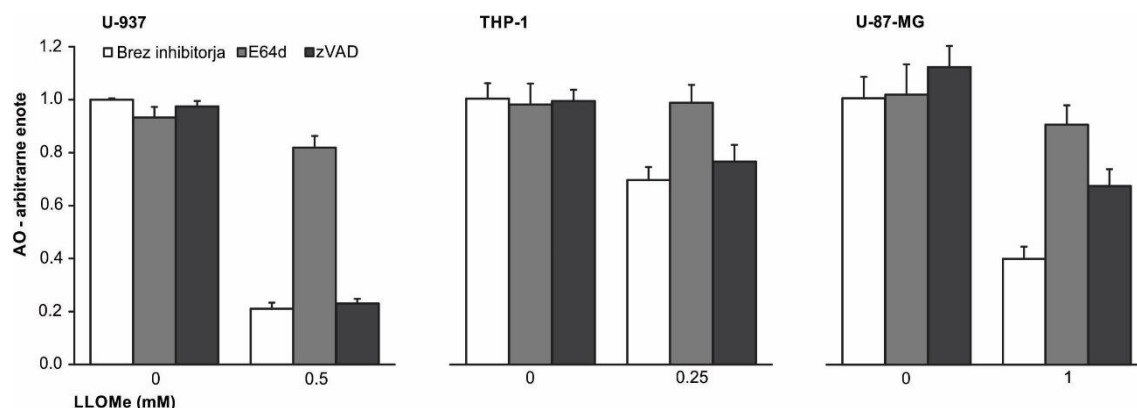
Ker je GlyPheDMK pokazal zaščitni učinek pred celično smrtjo, smo preverili, če vpliva tudi na stabilizacijo lizosomov (slika 32B). Po 30-minutni inkubaciji z izbrano koncentracijo LLOMe so celice izgubile zmožnost kopičenja barvila, vendar smo ta učinek uspeli preprečiti z inhibitorjem katapsina C. S tem smo dodatno potrdili našo domnevo, da je katapsin C začetni dejavnik pri celični smrti, sproženi z LLOMe.



Slika 32: LLOMe vpliva na lizosome. A) Po 30-minutnem tretiranju celic U-937, THP-1 in U-87-MG z različnimi koncentracijami LLOMe smo celicam dodali barvilo akridin oranž (AO). Vzorce smo nato pripravili na analizo s pretočnim citometrom. Rezultati predstavljajo geometrijsko sredino intenzitete fluorescence, ki smo jo preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Celice smo najprej 2 h inkubirali z GlyPheDMK (10 μ M), nato pa še 30 minut z LLOMe. Po končani inkubaciji smo vzorce pripravili kot na sliki 32A). Baf – bafilomicin (uporabljen kot pozitivna kontrola).

Vse tri celične linije je pred učinki LLOMe v veliki meri zaščitil tudi inhibitor cisteinskih katepsinov E64d (slika 33), saj je bila intenziteta fluorescence skoraj enaka kot v netretiranih vzorcih. V nasprotju z E64d pa inhibitor zVAD ni preprečil poškodb lizosomov pri kateri koli testirani celični liniji. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da imajo cisteinski katepsini pomembno vlogo pri celični smrti po tretiranju z LLOMe. Kaspaze pa imajo najverjetneje bolj izvršitveno vlogo in so nižje v kaskadi celične smrti. Preverili smo tudi, da po 30-minutni inkubaciji z LLOMe ni povišanja odstotka celične smrti (rezultati niso prikazani), kar je dodatno potrdilo našo domnevo, da je okvara lizosomov zgodnji dogodek pri celični smrti.

Znižanje intenzitete fluorescence je lahko posledica zvišanja pH v lizosomih ali pa destabilizacije lizosomske membrane. Da bi potrdili permeabilizacijo lizosomske membrane (LMP) in sprostitve proteaz iz lizosomov po tretiranju z LLOMe, je potrebno njihovo aktivnost izmeriti v citosolnih lizatih (Repnik, Cesen, in sod., 2016b; Repnik, Hafner Cesen, in sod., 2016).

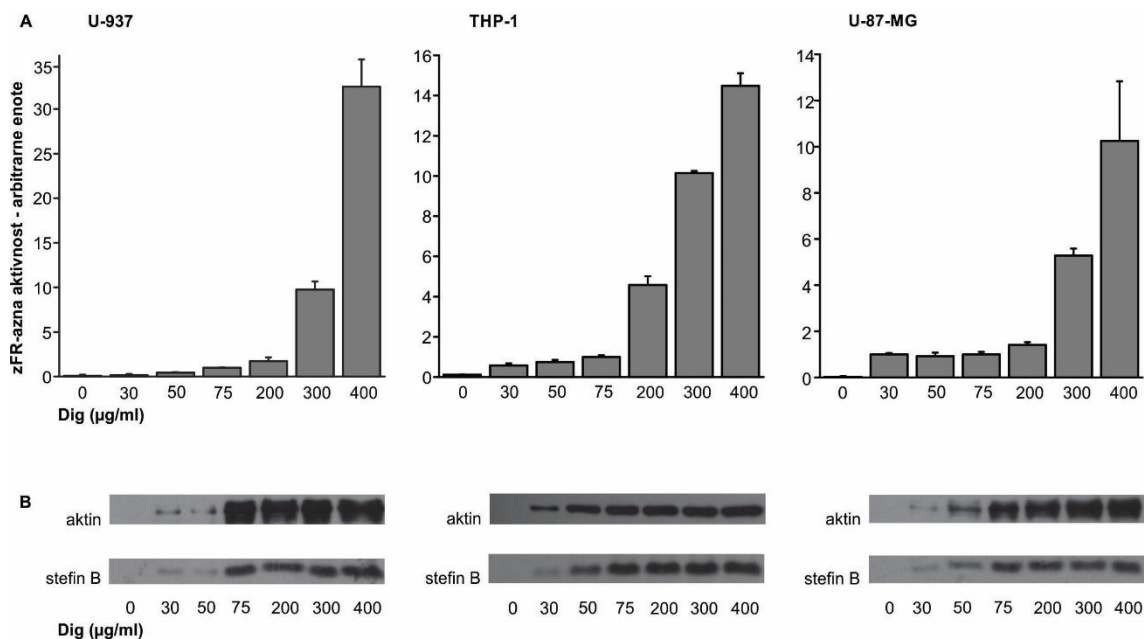


Slika 33: Vpliv E64d in zVAD na kopičenje barvila akridin oranž po tretiranju z LLOMe. Celice smo inkubirali z E64d (20 μ M) ali pa zVAD (10 μ M) 2 h. Nato smo dodali ustrezne količine LLOMe za 30 minut celicam U-937, THP-1 in U-87-MG. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z akridin oranžem ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Rezultati predstavljajo geometrijsko sredino intenzitete fluorescence, ki smo jo preračunali na arbitrarne enote. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

4.2.4 LLOMe deluje kot lizosomotropični detergent

Rezultati barvanja celic z akridin oranž po tretiranju z LLOMe in različnimi inhibitorji (slika 32, slika 33) so pokazali, da sta tako inhibitor katepsina C in splošni inhibitor cisteinskih katepsinov preprečila destabilizacijo lizosomov. V naslednjem koraku smo želeli potrditi, da LLOMe povzroči sprostitve lizosomskih hidrolaz v citosol. Njihovo prisotnost smo ugotavljali na dva načina: z merjenjem aktivnosti cisteinskih katepsinov na osnovi hidrolize substrata zFR-AMC v supernatantu lizatov in s prenosom po westernu ter imunodetekcijo cisteinskih katepsinov v citosolnih in popolnih lizatih.

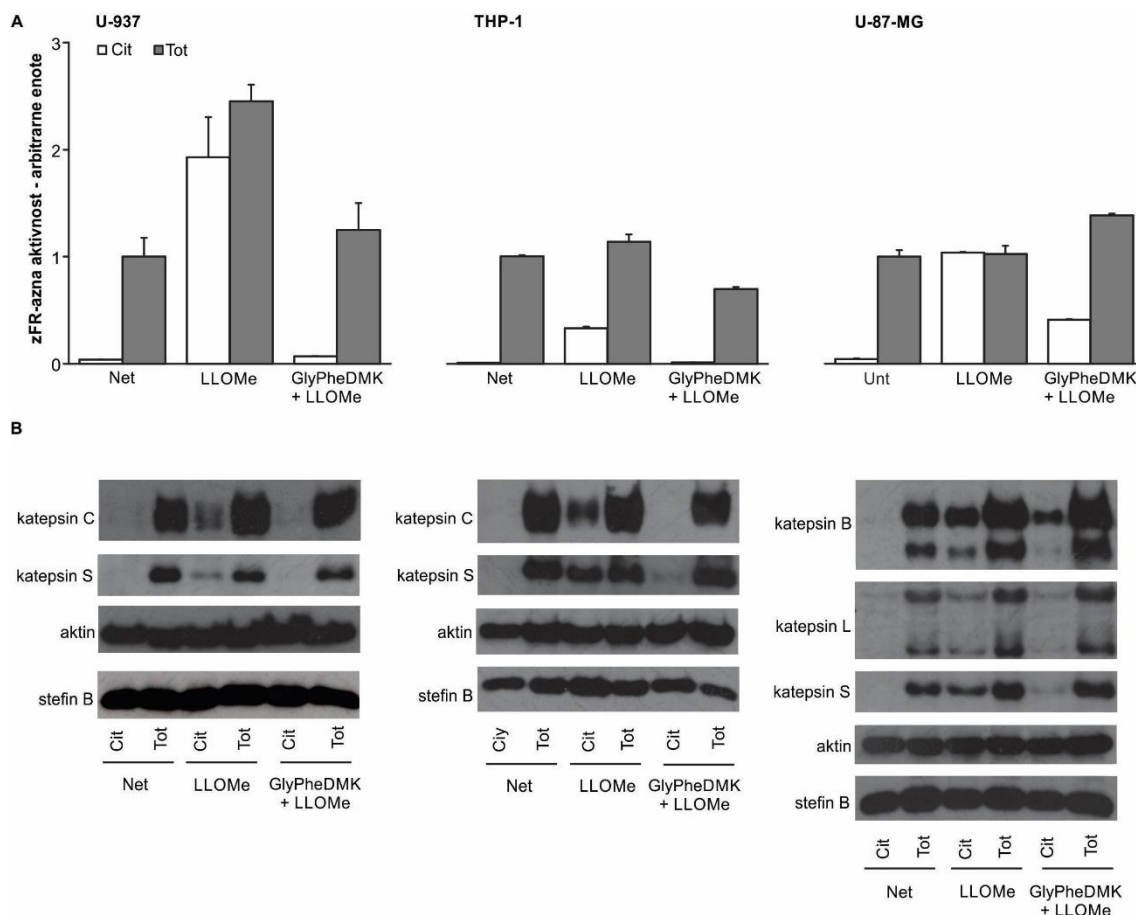
Najprej smo določili ustrezno koncentracijo digitonina, ki je bila potrebna za selektivno lizo plazemske membrane (slika 34A). Testirali smo koncentracije digitonina od 0 do 400 μ g/ml. Na podlagi rezultatov smo zaključili, da je za lizo plazemske membrane in meritve citosolne aktivnosti potreben digitonin s koncentracijo 75 μ g/ml pri vseh celičnih linijah. Tako izmerjena katepsinska aktivnost v citosolnih lizatih predstavlja manj kot 10 % aktivnosti v popolnih celičnih lizatih, pripravljenih z digitoninom s koncentracijo 400 μ g/ml. Uspešnost ekstrakcije proteinov pri pripravi lizatov smo preverili še z imunodetekcijo aktina in stefina B, ki smo ju nadalje uporabljali kot kontrolo (slika 34B).



Slika 34: Optimizacija koncentracij digitonina za pripravo citosolnih lizatov na celicah. A) Celicam smo dodali različne koncentracije digitonina, da bi sprožili le lizo plazemske membrane (30, 50 in 75 $\mu\text{g/ml}$ za citosolni lizat) ali pa lizo vseh celičnih membran (200, 300 in 400 $\mu\text{g/ml}$ za popolni lizat). Po inkubaciji na ledu in centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katapsinov v supernatantu lizata izmerili fluorimetrično. Hidrolizo substrata Z-FR-AMC smo merili 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). Na grafih so predstavljeni podatki v arbitrarnih enotah. Slika 34A prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Enak volumen vzorcev smo nanesli na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za aktin in stefin B, ki smo ju nadalje uporabljali za kontrolo.

V kolikor pride do LMP in sproščanja lizosomskih proteaz v citosol po tretiranju z lizosomotropikom, lahko zaznamo njihovo aktivnost v citosolu. Celicam smo najprej dodali GlyPheDMK za 2 h in nato po 15-minutni inkubaciji z LLOMe pripravili citosolne ter totalne celične lizate.

Rezultati so pokazali povišano aktivnost cisteinskih katapsinov v citosolu po dodatku LLOMe v primerjavi z negativno kontrolo v vseh celičnih modelih (slika 35A). Rezultate smo potrdili še z imunodetekcijo katapsinov. Na sliki 35B je razvidno, da po dodatku LLOMe pride do poškodb lizosomske membrane, posledično smo zaznali katapsine v citosolu. Ko smo celicam predhodno dodali inhibitor katapsina C, pa se je citosolna aktivnost katapsinov znižala skoraj na raven netretiranega vzorca in v vzorcih po imunodetekciji nismo zaznali katapsinov (slika 35A, B). Na podlagi tega smo prišli do zaključka, da LLOMe povzroči permeabilizacijo lizosomskih membran in ne vpliva zgolj na pH lizosomov, kar je v skladu s predhodnimi rezultati naše skupine (Droga-Mazovec in sod., 2008).



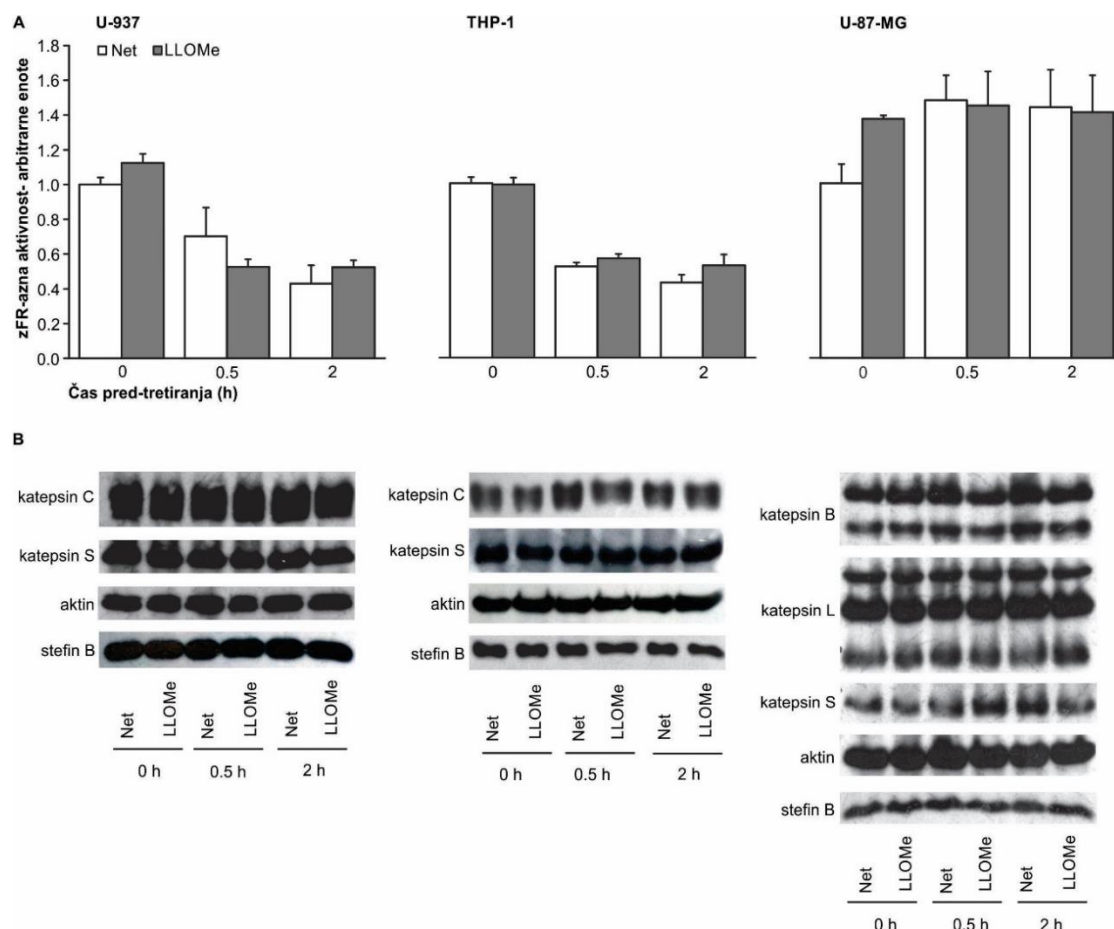
Slika 35: Citosolna in celokupna aktivnost cisteinskih katepsinov celic U-937, THP-1 in U-87-MG po tretiranju z LLOMe. A) Celice smo tretirali z GlyPheDMK 2 h in zatem smo dodali ustrezno koncentracijo LLOMe za 15 min (0,5 mM za U-937, 0,25 mM za THP-1 in 1 mM za U-87-MG). Po inkubaciji smo celice centrifugirali in pripravili citosolne (75 µg/ml digitonin) ter totalne (400 µg/ml digitonin) lizate. Po centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katepsinov izmerili na podlagi hidrolize substrata zFR-AMC, merili pa smo 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). Na grafih so predstavljeni podatki v arbitrarnih enotah. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Enak volumen vzorcev smo nanесли na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za katepsin C, S, B in L ter aktin in stefin B, ki smo ju uporabljali za kontrolo. Net – netretiran, Cit – citosolni lizat/citosolna aktivnost, Tot – totalni lizat/celokupna aktivnost.

Nedavno je bilo objavljeno, da naj bi po dodatku LLOMe celicam HeLa prišlo zgolj do delnega LMP, zato naj bi lizosomske hidrolaze, vključno s katepsini, ostale v lizosomih in se tam razgradile. Po 24 h pa naj bi prišlo do obnove lizosomov (Repnik in sod., 2017). Zato smo pripravili vzorce, ki smo jih 30 min ali 2 h predtretirali z GlyPheDMK in nato dodali LLOMe. V totalnih celičnih lizatih smo nato izmerili zFR-azno aktivnost in z imunodetekcijo ugotavljali, kaj se dogaja s katepsini.

Rezultati meritev katepsinske aktivnosti in imunodetekcije po prenosu western so pokazali (slika 36A), da je LMP katepsinom omogočil izhod v citosol. Za preverjanje razgradnje hidrolaz po tretiranju z LLOMe smo pripravili totalne lizate. S slike 36A je razvidno, da je aktivnost cisteinskih katepsinov v netretiranih vzorcih skoraj popolnoma enaka aktivnosti v vzorcih z dodanim LLOMe. Prav tako nismo opazili nobenih razlik na ravni proteinov med netretiranimi vzorci in vzorci, tretiranimi z LLOMe (slika 36B).

Pri celicah U-937 in THP-1 se je celokupna aktivnost v primeru predtretiranja z GlyPheDMK nekoliko zmanjšala, vendar še vedno ni bilo nobene razlike med vzorci brez ali pa z dodanim LLOMe. Signifikantne razlike nismo opazili niti glede na čas predtretiranja z inhibitorjem katepsina C (slika 36A). Kljub nekoliko nižani katepsinski aktivnosti pri vzorcih z dodanim GlyPheDMK pa ni bilo razlik med izraženimi katepsini, kar smo potrdili z imunodetekcijo (slika

36B). Pri celicah U-87-MG nismo opazili zmanjšane aktivnosti po dodatku GlyPheDMK, kar bi lahko bilo posledica nižjega izražanja katepsina C v primerjavi z U-937 in THP-1 (tabela 7, slika 29). S tem smo dokazali, da LLOMe v naših celičnih modelih ne inhibira aktivnosti cisteinskih katepsinov in ne sproži njihove razgradnje.



Slika 36: Celokupna aktivnost cisteinskih katepsinov celic U-937, THP-1 in U-87-MG po tretiranju z LLOMe v kombinaciji z GlyPheDMK. A) Celice smo tretirali z GlyPheDMK od 0 h do 2 h in zatem dodali ustrezno koncentracijo LLOMe za 15 min (0,5 mM za U-937, 0,25 mM za THP-1 in 1 mM za U-87-MG). Po inkubaciji smo celice centrifugirali in pripravili totalne lizate (400 µg/ml digitonin). Po centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katepsinov izmerili na podlagi hidrolize substrata zFR-AMC, merili pa smo 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). Na grafih so predstavljeni podatki v arbitrarnih enotah. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Enak volumen vzorcev smo nanесли na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za katepsin C, S, B in L ter aktin in stefin B, ki smo ju uporabljali za kontrolo. Net – netretiran.

4.2.5 Vpliv LLOMe na celice PyMT divjega tipa in celice z izbitim genom za stefin B

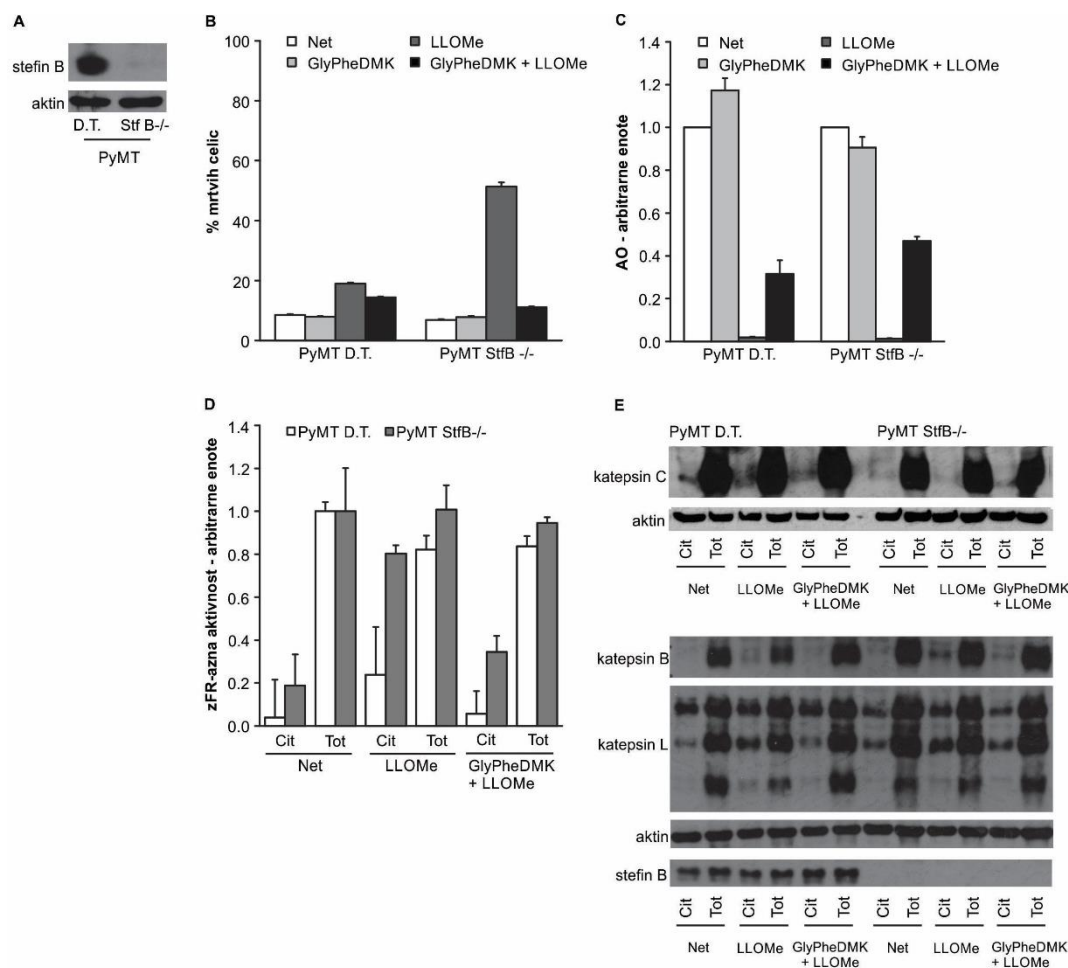
Stefin B je splošni inhibitor cisteinskih katepsinov in ima pomembno vlogo pri preprečevanju poškodb, ki bi nastale v primeru izlitja lizosomske vsebine v citosol (Butinar in sod., 2014; V. Turk in sod., 2008). V naslednjem koraku nas je zanimalo, če bi izbitje gena za stefin B povečalo občutljivost primarnih celic PyMT na tretiranje z LLOMe.

Najprej smo preverili izražanje stefina B v celicah PyMT D.T. (divjega tipa) in PyMT Stf B-/- (z izbitim genom za stefin B) z imunodetekcijo v totalnih lizatih (slika 37A). Da bi ugotovili vpliv odsotnosti stefina B na preživetje celic po izpostavitvi lizosomotropičnemu detergentu, smo celice PyMT D.T. in PyMT Stf B-/- 2 h predtretirali z GlyPheDMK, nato pa dodali LLOMe (slika 37B). Iz rezultatov je razvidno, da so primarne celice PyMT D.T. manj občutljive kot PyMT Stf

B^{-/-}, saj smo izmerili 30 % več mrtvih celic po tretiranju s 3 mM LLOMe. Ko smo dodali sintetični inhibitor katepsina C, smo celično smrt uspešno inhibirali v obeh celičnih modelih.

Zanimalo nas je tudi, ali izbitje gena za stefin B vpliva tudi na prevzemanje barvila akridin oranž (slika 37C). Izkazalo se je, da ni bilo nobene razlike med celicami PyMT D.T. in PyMT Stf B^{-/-} po tretiranju z LLOMe (slika 37C), prav tako je GlyPheDMK v enaki meri omejil vpliv na lizosome. Glede na to, da je LLOMe povzročil destabilizacijo lizosomov, smo preverili, ali je posledično prišlo tudi do iztekanja katepsinov v citosol. Ko smo izmerili aktivnost cisteinskih katepsinov, smo ugotovili, da je bila zFR-azna aktivnost v citosolnih lizatih celic PyMT Stf B^{-/-} po tretiranju z LLOMe štirikrat višja kot v celicah PyMT D.T. (slika 37D). V vzorcih citosolnih lizatov s predhodno dodanim GlyPheDMK pa je bila aktivnost sorazmerno podobna netretiranim vzorcem. Za potrditev LMP smo še dodatno naredili prenos po westernu in imunodetekcijo izbranih proteinov (slika 37E). Po pričakovanjih smo prisotnost katepsinov zaznali v citosolnih lizatih vzorcev po 15 min inkubaciji z LLOMe.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo sklepali, da LLOMe ne promovira razgradnje cisteinskih katepsinov, ampak pride do prehajanja hidrolaz v citosol preko naluknjane membrane. Poleg tega je to posredni dokaz, da so cisteinski katepsini pomembni pri poteku celične smrti, sprožene z LLOMe, in da ima stefin B pomembno vlogo kot anti-apoptotični ligand pri celični smrti, kjer imajo ključno vlogo katepsini.



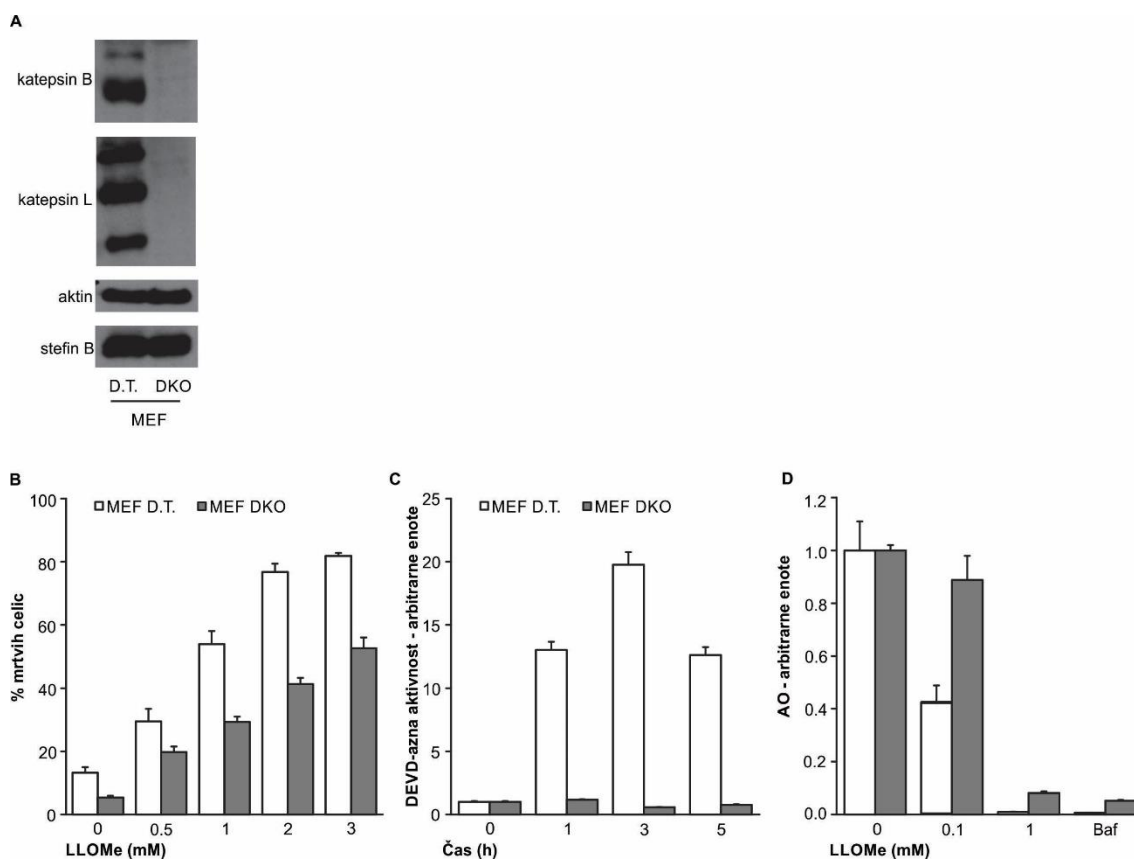
Slika 37: Vpliv LLOMe na celice PyMT divjega tipa (D.T.) in celice z izbitim genom za stefin B (StfB -/-). A) Imunodetekcija stefina B in aktina v celicah PyMT. Celice smo gojili na ploščah s premerom 10 cm in nato pripravili popolne celične lizate v pufru RIPA. Proteine smo ločili na NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi. B) Celice PyMT smo 2 h predtretirali z 10 μ M GlyPheDMK, nato pa smo dodali 3 mM LLOMe za 18 h. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. C) Celice PyMT smo 2 h predtretirali z 10 μ M GlyPheDMK, nato pa smo dodali 3 mM LLOMe za 0,5 h. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z akridin oranžem ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. D) Celice smo tretirali z GlyPheDMK 2 h in zatem dodali 3 mM LLOMe za 15 min. Po inkubaciji smo celice centrifugirali in pripravili citosolne (75 μ g/ml digitonin) ter totalne (400 μ g/ml digitonin) lizate. Po centrifugiranju smo aktivnost cisteinskih katapsinov izmerili na podlagi hidrolize substrata zFR-AMC, merili pa smo 30 minut. Iz podatkov smo izračunali spremembo fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice). E) Enak volumen vzorcev smo nanесли na gel in proteine ločili na NaDS PAGE. Po prenosu na nitrocelulozno membrano smo proteine označili s specifičnimi protitelesi za katapsin C, B in L ter aktin in stefin B. Slike B, C in D prikazujejo en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. Net – netretiran, Cit – citosolni lizat/citosolna aktivnost, Tot – totalni lizat/celokupna aktivnost.

4.2.6 Vpliv LLOMe na celice MEF divjega tipa in celice z izbitima genoma za katapsin B in L

Na podlagi prejšnjih rezultatov smo sklepali, da imajo cisteinski katapsini pomembno vlogo pri celični smrti, sproženi z LLOMe. Za določitev vpliva cisteinskih katapsinov na zmanjšanje preživetja celic smo uporabili celice MEF divjega tipa (MEF D.T.) in celice MEF z izbitima genoma za katapsin B in L (MEF DKO, angl. double knockout).

Najprej smo preverili izražanje obeh katepsinov z imunodetekcijo totalnih lizatov (slika 38A). V naslednjem koraku smo celice tretirali z različnimi koncentracijami LLOMe. Iz rezultatov je razvidno, da so celice MEF DKO manj občutljive kot celice MEF D.T., kar se je odrazilo v več kot 20 % razliki in v zamiku povišanja odstotka mrtvih celic (slika 38B). Za določitev aktivacije izvršitvenih kaspaz smo še dodatno izmerili DEVD-azno aktivnost v celičnih lizatih. Po tretiranju z 1 mM LLOMe je kaspazna aktivnost v celicah MEF D.T. naraščala v odvisnosti od časa in je dosegla vrh po 3-urni inkubaciji (slika 38C). V lizatih celic MEF DKO pa kaspazna aktivnost sploh ni narasla.

Preverili smo tudi, kako je s kopičenjem barvila akridin oranž pri obeh genotipih po tretiranju z LLOMe. Na sliki 38D vidimo, da pri celicah MEF D.T. že 0,1 mM LLOMe povzroči zmanjšanje privzemanja barvila, medtem ko je pri celicah MEF DKO ostalo stanje lizosomov nespremenjeno. Pri višjih koncentracijah LLOMe pa vseeno pride do znižanja fluorescence. Ti rezultati so v skladu z izsledki Cirman in sod., 2004, in neobjavljenimi rezultati Bojić in sod..



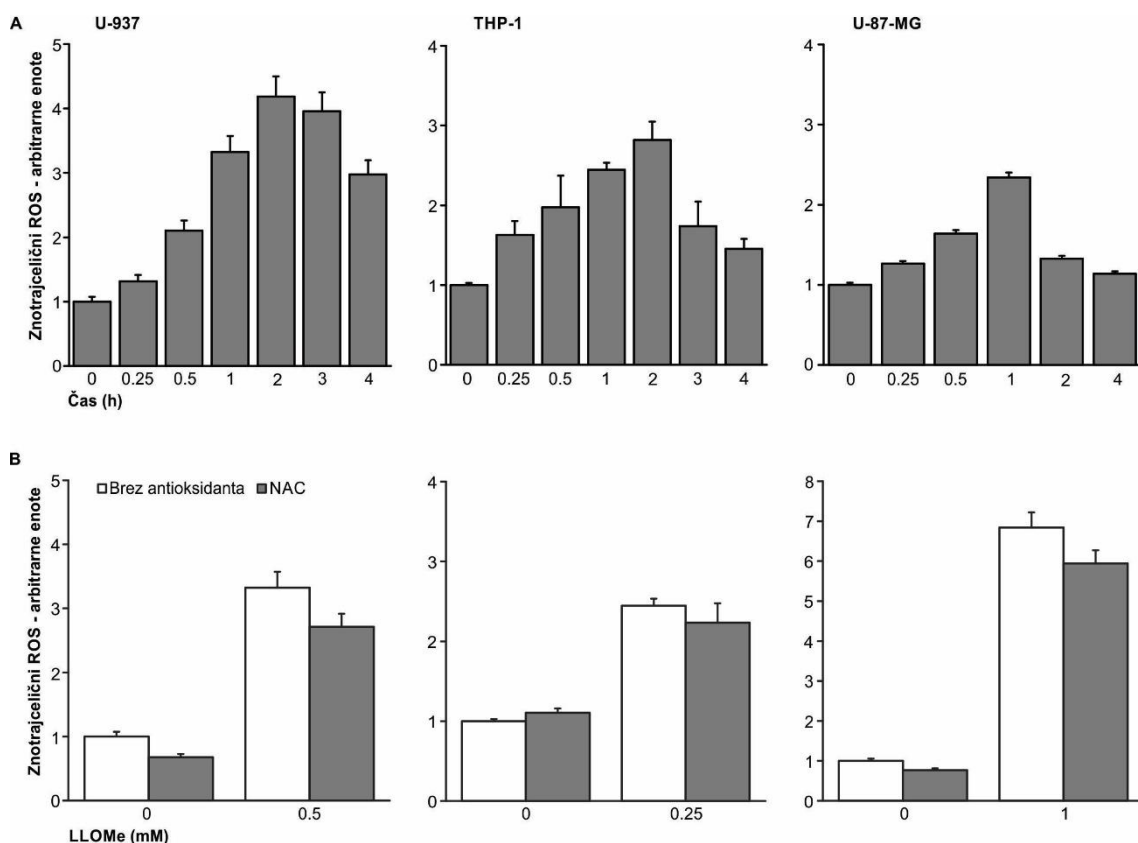
Slika 38: Vpliv LLOMe na celice MEF divjega tipa (D.T.) in celice z izbitima genoma za katepsin B in L (DKO). A) Imunodetekcija katepsina B, katepsin L, stefina B in aktina v celicah MEF. Celice smo gojili na ploščah s premerom 10 cm in nato pripravili popolne celične lizate v RIPA pufu. Proteine smo ločili na NaDS PAGE in prenesli na nitrocelulozno membrano ter označili s specifičnimi protitelesi. B) Celice MEF smo 5 h tretirali z različnimi koncentracijami LLOMe. Po končani inkubaciji smo celice pobarvali z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. C) Celicam MEF smo dodali 1 mM LLOMe. Po končani inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate. Kaspazno aktivnost smo merili fluorimetrično s hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC (10 μ M). Rezultati so bili podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti oz. hitrost reakcije (naklon premice), nato pa normalizirani na kontrolo (v času 0 h). D) Celicam MEF smo dodali različne koncentracije LLOMe in 100 nM bafilomicin (Baf) smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Po polurni inkubaciji smo celice pobarvali z akridin oranžem ter vzorce analizirali s pretočnim citometrom. Slike B, C in D prikazujejo en reprezentativen poskus, stolpci pa predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev s SD.

Tako lahko potrdimo našo hipotezo, da katepsin C v prvem koraku polimerizira LLOMe, ki pridobi membranolitične lastnosti. V naslednjem koraku pride do iztoka katepsinov iz lizosoma v citosol, kjer preko cepitve Bid v tBid sprožijo celično smrt. Prav tako pride do prehajanja citokroma C v citosol že 1 h po dodajanju LLOMe. V zadnjem koraku je sama izvršitev apoptoze odvisna od kaspaz.

4.2.7 LLOMe vpliva na povišanje oksidativnega stresa v celicah

Cirman in sod. so leta 2004 objavili študijo, v kateri je bilo prikazano, da destabilizacija lizosomov lahko privede do sproščanja protonov iz lizosomov v citosol, poškodbo DNA in zunanje mitohondrijske membrane (Boya in Kroemer, 2008; Cirman in sod., 2004). Zato smo se odločili preveriti, ali pri tretiranju celic z LLOMe nastanejo ROS. Celice U-937, THP-1 in U-87-MG smo inkubirali z ustreznimi koncentracijami LLOMe in spremljali nastanek ROS v odvisnosti od časa z uporabo pretočne citometrije. V skladu s pričakovanji smo ugotovili, da so ROS začeli nastajati po destabilizaciji lizosomov (slika 32A; slika 35A; slika 39A) in da so vrh dosegli okvirno 1 h po tretiranju.

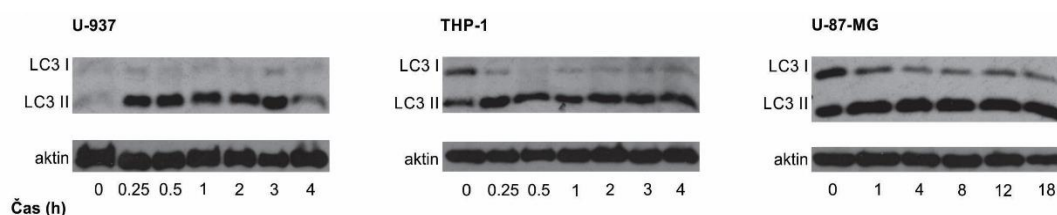
Zanimalo nas je tudi, če bi lahko nastanek ROS omejili z uporabo antioksidanta NAC. Kot je razvidno s slike 39B, NAC ni imel pozitivnega vpliva na oksidativni stres. Glede na rezultate smo lahko sklepali, da ROS niso imeli ključne vloge pri delovanju LLOMe in niso glavni vzrok smrti.



Slika 39: LLOMe vpliva na nastajanje znotrajceličnih ROS. A) Najprej smo spremljali nastajanje znotrajceličnih ROS v odvisnosti od časa. Celice U-937 smo tretirali z 0,5 mM LLOMe, THP-1 z 0,25 mM in U-87-MG z 1 mM LLOMe od 0 do 4 h. Po končani inkubaciji smo celicam dodali barvilo CM-H₂DCFDA in vzorce pripravili za analizo s pretočnim citometrom. Stolpci predstavljajo geometrijsko sredino intenzitete fluorescence za vsak vzorec in preračunano na arbitrarne enote. Slika prikazuje en reprezentativen poskus, stolpci pa povprečje treh tehničnih ponovitev s SD. B) Celice smo tretirali z LLOMe. Antioksidant (1 mM NAC) smo v gojišče dodali 2 h pred tretiranjem z LLOMe. Po 1-urni inkubaciji smo vzorce pripravili, kot je navedeno na sliki 39A).

4.2.8 LLOMe vpliva na avtofagijo

Naluknjanje lizosomov naj bi sprožilo avtofagijo, zato smo z imunodetekcijo po prenosu western preverjali prisotnost lipidirane in nelipidirane oblike proteina LC3. Opazili smo, da je pri celicah THP-1 in U-87-MG razmeroma visoko bazalno raven avtofagije, saj smo v netretiranem vzorcu zaznali tako LC3 I kot LC3 II obliko. Po tretiranju z LLOMe je v vseh celičnih modelih prišlo do kopičenja LC3 II oblike (slika 40) že po 15-minutni inkubaciji. Pri celicah THP-1 in U-87-MG pa je vidno tudi izginjanje proteina LC3 I. Rezultati poskusa so skladni z ugotovitvami Maejima in sod. (Maejima in sod., 2013), ki so pokazali, da so poškodovani lizosomi odstranjeni z avtofagijo. Kopičenje LC3 II pa bi lahko bilo posledica tudi inhibirane razgradnje LC3 II zaradi spremenjenega pH lizosomov in onemogočene razgradnje avtofagosomov (J. Zhang, 2015; L. Zhang in sod., 2015). Naše ugotovitve bi tako morali potrditi še z detekcijo proteina p62, ki deluje kot signalni protein oz. sodeluje pri dostavi organelov v avtofagosom, ali pa spremljati potek avtofagije z LC3-RFP-GFP (Anding in Baehrecke, 2017; Klionsky in sod., 2012).



Slika 40: Sprememba LC3 na proteinski ravni celic U-937, THP-1 in U-87-MG po tretiranju z LLOMe. Celice smo tretirali z 0,5 mM LLOMe (U-937), 0,25 mM LLOMe (THP-1) in 1 mM LLOMe (U-87-MG). Po ustrezno dolgih inkubacijah smo pripravili popolne celične lizate v RIPA pufu in proteine ločili z NaDS PAGE. Nato smo opravili prenos na nitrocelulozno membrano ter označili proteine s specifičnimi protitelesi.

Razprava

Razprava zajema dva dela. Prvi del razprave obsega vpliv različnih antioksidantov na oksidativni stres in celično smrt v celicah MEF in L929. Drugi del razprave pa je osredotočen na proučevanje mehanizma delovanja sintetične spojine L-levcil-L-levcin metilni ester v različnih celičnih modelih.

5.1 Vpliv antioksidantov na oksidativni stres in celično smrt

Celica lahko umre po regulirani in neregulirani poti. Neregulirana oblika celične smrti oz. nekroza je opisana kot nenaden in nenadzorovan dogodek, ki ga sprožijo ekstremne fizikalne, kemične ali mehanske poškodbe. Regulirana celična smrt pa poteče kot posledica aktivacije najmanj ene signalne poti in je lahko bodisi farmakološko ali genetsko nadzorovana. Podskupina regulirane celične smrti je programirana celična smrt, ki ima fiziološki pomen (Galluzzi in sod., 2018). Različne oblike celične smrti spremlja nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Dosedanje študije so pokazale, da naj bi ROS imele pomembno vlogo predvsem v klasični nekrozi. Pri drugih oblikah celične smrti, kjer sta prisotna tako porušenje mitohondrijskega membranskega potenciala kot povišanje ROS, pa njihov pomen še ni popolnoma pojasnjen (Goossens in sod., 1999; Moloney in Cotter, 2018; Vanden Berghe in sod., 2014; Wu in sod., 2012).

Z namenom natančnejše opredelitve vpliva oksidativnega stresa na celično smrt smo v doktorski nalogi uporabili tri različne sprožilce. Za spremljanje celične smrti smo najprej analizirali celice, označene z aneksinom V-PE in propidijevim jodidom, nato pa smo preverili, ali se sproži aktivacija kaspaz. Na podlagi meritev smo zaključili, da smo z menadionom (MD) sprožili nekrozo in s staurosporinom (STS) intrinzično pot apoptoze. Ekstrinzično pot apoptoze ter nekroptozo pa smo sprožili s tumor nekrotizirajočim dejavnikom (TNF) v prisotnosti inhibitorjev (cikloheksimida in splošnega inhibitorja kaspaz, kjer je to navedeno; slika 11 in slika 13). Poleg tega smo pokazali, da vsi trije sprožilci sprožijo tudi avtofagijo (slika 14 in slika 15). Naši rezultati so skladni z minulimi študijami, ki prikazujejo, da se lahko avtofagija in celična smrt pojavljata istočasno ali pa zaporedno v celici kot odziv na enak dražljaj (Platini in sod., 2010; Shen Han-Ming, 2014; Thorburn, 2008).

V naslednjem koraku nas je zanimalo, ali pride do porasta znotrajceličnih ROS po izpostavitvi sprožilcem in kdaj v kaskadi celične signalizacije to zaznamo. V naši študiji smo pokazali, da je bil MD najbolj učinkovit sprožilec oksidativnega stresa, saj so ROS nastali že po 30-minutni inkubaciji (slika 16). Tak primer je bil tudi STS, kjer je bilo povišanje oksidativnega stresa bolj postopno in je prišlo do izrazitega povišanja po 1 h. Pri tretiranju z MD in STS je bil nastanek znotrajceličnih ROS zgodnji dogodek, ki smo ga zaznali pred pojavom celične smrti (slika 11). Pri tretiranju s TNF pa smo opazili povišanje oksidativnega stresa šele po 10 h, ko so celice že umirale, kar je v skladu z rezultati, objavljenima študijama iz leta 2014 (Jouan-Lanhouet in sod., 2014; Vanden Berghe in sod., 2014).

Celice so neprestano izpostavljene ROS, ki so znotrajceličnega ali zunanega izvora. ROS lahko oksidirajo DNA in ostale celične gradnike, zato so eden izmed glavnih povzročiteljev poškodb v bioloških sistemih. Vse nepopravljivo poškodovane biomolekule, kot so DNA, proteini in lipidi, se nato odstranijo z avtofagijo (Filomeni in sod., 2015; Lee in sod., 2012; Navarro-Yepes in sod., 2014; Platini in sod., 2010). Iz naših rezultatov je razvidno, da pri vzorcih, tretiranih z MD in STS, s stimulacijo avtofagije sovpadata porast H_2O_2 in mitohondrijskega O_2^- (slika 14–17). Ti rezultati so v skladu s študijo Jianga in sod., kjer so pokazali, da STS v celicah HeLa brez citokroma C ali brez mtDNA še vedno sproži nastajanje ROS in avtofagijo (Jiang in sod., 2011). Avtofagija je bila sprožena kot zaščitni mehanizem pred kopičenjem oksidiranih proteinov, ki lahko tvorijo proteinske agregate, z mitofagijo pa naj bi bili odstranjeni poškodovani mitohondriji, ki so neusahljiv vir ROS. ROS naj bi tako samo posredno sprožili avtofagijo. Glede na to, da je bila avtofagija najverjetneje sprožena kot obrambni mehanizem pred oksidativnim stresom, bi jo lahko umestili med ključne antioksidativne dejavnike v celici (Navarro-Yepes in sod., 2014). Ker stimulacija avtofagije ni bila zadostna za ponovno vzpostavitev ravnotežja med oksidanti in antioksidanti, je kljub temu prišlo do zmanjšanja viabilnosti celic.

V poskusih smo uporabili štiri različne antioksidante: NAC, α TOC, MnTBAP in Tempol. Hidrofilni antioksidant NAC, ki pomaga pri vzdrževanju redoks ravnovesja ali pa deluje neposredno kot odstranjevalec prostih radikalov preko tiolne skupine, je bil edini, ki je učinkovito nevtraliziral ROS po tretiranju celic MEF z MD, nekoliko manj uspešen je bil v celicah L929

(slika 18A in slika 20A). Kljub vsemu ostali antioksidanti niso uspeli popolnoma nevtralizirati ROS, ki so nastali v prisotnosti drugih sprožilcev celične smrti. Delno sta nastanek ROS omejila SOD mimetika MnTBAP in Tempol. Tempol je zelo učinkovito preprečil oksidativni stres, sprožen s TNF v celicah MEF (slika 18C, D). Iz tega smo sklepali, da nastalih ROS, kot posledice izpostavitve različnim sprožilcem celične smrti, ne moremo vedno nevtralizirati z uporabo lovilcev ROS. To bi lahko bilo posledica tega, da ima vsak od uporabljenih antioksidantov drugačen mehanizem delovanja. MD namreč vpliva na dihalno verigo, kjer nastane superoksidni ion in vodikov peroksid. NAC oskrbuje GSH peroksidazo s cisteini, GSH peroksidaza pa lahko nevtralizira tako nastali vodikov peroksid. Poleg tega lahko NAC in oksidativni stres aktivirata transkripcijska dejavnika NF κ B in Nrf2, ki nadzorujeta izražanje genov za številne antioksidativne proteine, vključno z MnSOD, katalazo in GSH peroksidazo, ter tako omejita oksidativni stres (Cho in sod., 2015; V. O. Kaminsky in Zhivotovsky, 2014; Moloney in Cotter, 2018; Morgan in Liu, 2011).

V nasprotju z NAC, α TOC ni uspel popolnoma odstraniti ROS v naluknjanih mitohondrijih (slika 19; slika 20), kar je v skladu z literaturo (Kruglov in sod., 2008; Luo in sod., 2009). Kljub vsemu pa so znane številne študije, kjer je prikazano, da α TOC preprečuje peroksidacijo nenasičenih maščobnih kislin membran in pretvarjanje ROS naprej v hidroksilni radikal (Cesen in sod., 2013; Ott in sod., 2007). Pri tem se α TOC oksidira in reciklira ob prisotnosti vitamina C ali pa koencima Q. V kolikor vseeno pride do peroksidacije membranskih lipidov, nastanejo pri tem reaktivni aldehidi, ki prosto potujejo po celici in imajo uničujoč učinek na mitohondrijsko delovanje ter posledično smrt celice (Bourassa MG, 2006; Ott in sod., 2007; Pamplona, 2008). Objavljeno je bilo tudi, da je α TOC preprečil oksidacijo kardiolipina po izpostavitvi siramizinu, vendar NAC tega ni uspel preprečiti (Cesen in sod., 2013). Tako smo potrdili našo domnevo, da niso vsi lovilci ROS enako učinkoviti pri nevtraliziranju različno sproženega oksidativnega stresa.

Superoksid dismutaze nevtralizirajo superoksidne ione, kar pomembno prispeva k zmanjšanju oksidativnega stresa. V doktorski nalogi smo uporabili MnTBAP, ki je sintetičen nepeptidni SOD mimetik. Njegova prednost pred uporabo rekombinantnih SOD je, da lahko prehaja biološke membrane, ne izzove imunskega odziva in ima daljšo razpolovno dobo. MnTBAP naj bi z odstranjevanjem superoksidnega iona preprečil nastanek toksičnega peroksinitrita, ki nastane iz dušikovega monoksida. Poleg tega lahko nekateri SOD mimetiki, kot je MnTBAP, učinkovito nevtralizirajo vodikov peroksid, ki prehaja z difuzijo preko membran zaradi negativne nabitosti (Bourassa MG, 2006; Suresh in sod., 2013). Takšen tip delovanja je verjetno ključen, da je prišlo do delnega znižanja znotrajceličnih ROS ne glede na uporabljeni sprožilec celične smrti in do znižanja mitohondrijskih ROS v prisotnosti MD (slika 18C, slika 27).

Tempol, ki je prav tako SOD mimetik, je izzval nepričakovan odziv. V nizkih koncentracijah (do 0,1 mM) je znižal nastanek ROS po tretiranju z MD ali pa STS (slika 18D), pri visokih koncentracijah pa smo zaznali povišanje ROS. To je bilo zlasti nenavadno, saj smo z uporabo reagenta MitoSOX pokazali, da MD sproži nastajanje superoksidnega iona (slika 17A). Razlog za to je lahko nepopolno poznavanje delovanja Tempola, ki naj bi poleg SOD dejavnosti imel tudi sposobnost katalazne aktivnosti, sodeloval naj bi pri oksidaciji reduciranih kovinskih ionov v Fentonovi reakciji, oksidaciji semikinonskih radikalov itd. Poleg tega ima lahko Tempol oksidativno delovanje, če se pričenejo kopičiti njegovi oksidirani vmesni produkti (Krishna in sod., 1996; Samuni in sod., 1988; Soule in sod., 2007; Wilcox, 2010). V nekaterih študijah je bilo tudi pokazano, da ima Tempol citotoksično in genotoksično delovanje na primarne humane limfocite (Guo in sod., 2015; Lewinska in sod., 2008).

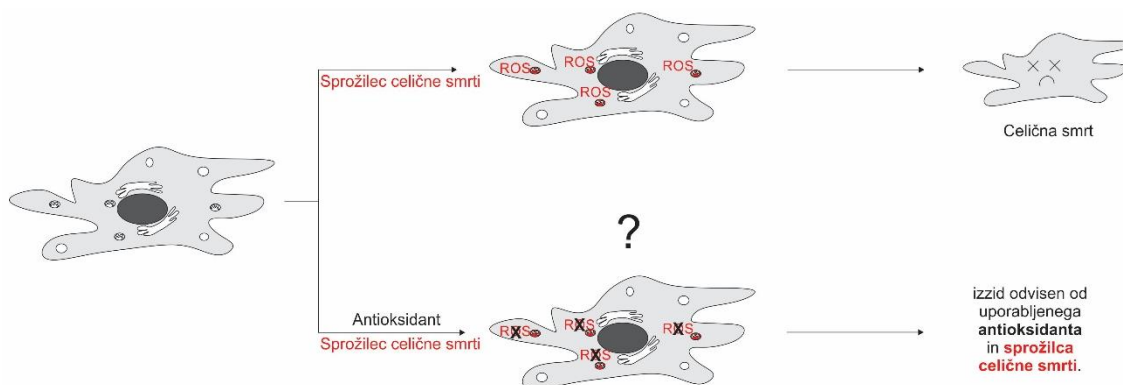
Vloga ROS v celični smrti ostaja še vedno le delno pojasnjena. Na podlagi rezultatov naše raziskave lahko zaključimo le, da so ROS pomembne pri klasični nekrozi, sproženi z MD, medtem ko je v ostalih modelih njihova vloga najverjetneje obstranska (Loor in sod., 2010; Ryter in sod., 2007). ROS so odgovorni za peroksidacijo kardiolipina, ki je potrebna za sproščanje citokroma C z mitohondrijske membrane med apoptozo, vendar v našem primeru uporabljeni antioksidanti niso preprečili apoptotične celične smrti, sprožene s STS ali pa TNF (Moloney in Cotter, 2018; Ryter in sod., 2007; Sies, 2017; Sies in sod., 2017). Glede na to, da nismo uspeli popolnoma izničiti oksidativnega stresa z antioksidanti, je lahko celična smrt tudi posledica nezadostne nevtralizacije ROS. Predpostavili smo, da nastajanje ROS gotovo ni ključen dogodek v celični smrti, sproženi s TNF, zato verjetno tudi popolna odstranitev ROS ne bi preprečila celične smrti, ampak bi jo le nekoliko časovno zamaknila. To je tudi v skladu z minulimi študijami, kjer so nakazali, da uporaba antioksidantov ni preprečila celične smrti, saj ROS niso edini sprožilec celične smrti (Jarvis in sod., 2007; Vanden Berghe in sod., 2010; Vandenabeele in sod., 2010).

V predstavljeni študiji smo pokazali, da je delovanje Tempola enigmatično. Visoke koncentracije (≥ 3 mM) Tempola v kombinaciji z MD so toksične, čeprav NAC lahko popolnoma prepreči celično smrt in oksidativni stres (slika 28), kar nakazuje, da je negativni učinek odvisen od ROS. Guo in sodelavci so pokazali, da je Tempol lahko genotoksičen ali pa citotoksičen. Kljub

vsemu pa je bil Tempol v enakih koncentracijah najbolj učinkovit pri preprečevanju celične smrti, sprožene s TNF. To je v skladu s študijo, kjer prikazujejo učinek Tempola pri preprečevanju celične smrti, sprožene z MD in TNF, v celicah HT-29. Prav tako naj bi učinkovito ščitil normalne celice pred radiacijo, rakave celice pa naj bi ostale enako občutljive. Zato je Tempol vključen v raziskave o preprečevanju alopecije pri rakavih bolnikih (Hahn in sod., 1992; Jouan-Lanhouet in sod., 2012; Metz in sod., 2004; Wilcox, 2010).

Tempol so uporabili tudi v nekaterih *in vivo* raziskavah, kjer je učinkovito preprečil celično smrt v mišjem modelu hipotenzije ter šoka, ki sta bila sprožena z vnetjem (Cauwels in sod., 2010). Pokazali so tudi, da Tempol izboljša delovanje okvarjenih mitohondrijev pri hipoksičnih podganah in zmanjšano aktivacijo NF κ B po tretiranju s TNF, prav tako pa prepreči nastajanje poškodb DNA in proteinov kot posledice delovanja citokinov in rastnih dejavnikov. Zato ni presenetljivo, da Tempol pogosto uporabljajo v *in vivo* študijah oksidativnega stresa (Georgakilas in sod., 2014; Mariappan in sod., 2007; Wilcox, 2010). Kljub vsemu ne moremo pojasniti, zakaj je Tempol preprečil celično smrt, samo na podlagi antioksidativnih lastnosti, saj je imel MnTBAP kot SOD mimetik minimalen učinek. Sklepamo, da je učinek pogojen z izbrano spojino, vendar je natančnejši mehanizem delovanja neznan.

Na podlagi naših rezultatov bi lahko zaključili, da nastanek ROS spremlja apoptozo, z MD sproženo nekrozo in nekroptozo. Vendar imajo ROS ključno vlogo samo v primeru celične smrti, sprožene z MD. Z uporabo različnih antioksidantov celične smrti nismo uspeli preprečiti, ampak smo jo zgolj upočasnili; izjema je bil le antioksidant NAC. Poleg tega smo ugotovili, da SOD mimetik Tempol učinkovito zaščiti celice pred celično smrtjo, sproženo s TNF, vendar je njegovo delovanje potrebno dodatno proučiti, saj nima zgolj antioksidativnih lastnosti (slika 41).



Slika 41: Grafični povzetek o vlogi ROS v celični signalizaciji. Vsi uporabljeni sprožilci celične smrti (menadion – MD, staurosporin – STS in tumor nekrotizirajoči dejavnik – TNF) lahko spodbudijo nastajanje ROS in temu sledi celična smrt. Izbrani antioksidanti so bolj ali manj učinkovito omejili vzbujeni oksidativni stres, vendar so celično smrt kljub vsemu le redko preprečili. Delovanje nekaterih antioksidantov je vprašljivo, zato jih je potrebno ponovno proučiti.

5.2 Mehanizem delovanja lizosomotropičnega detergenta LLOMe

Lizosomi so kisli organeli, ki so vključeni v številne celične procese in so pomembni za vzdrževanje celičnega ravnovesja. Delna permeabilizacija lizosomske membrane lahko sproži apoptozo, bolj obširna permeabilizacija pa sproži nekrozo (de Duve, 1983; Repnik in sod., 2013). Med LMP pride do iztekanja proteaz v citosol, kar lahko kasneje sproži aktivacijo kaspaz. Sprožanje celične smrti preko LMP ima velik potencial, saj le-ta lahko poteče neodvisno od programiranih signalnih poti, ki so lahko pri rakavih obolenjih okvarjene (Hanahan in Weinberg, 2011; Kirkegaard in Jaattela, 2009; Repnik in sod., 2012; B. Turk in Turk, 2009). Lizosomotropizem je lastnost spojin, največkrat šibkih baz, ki z difuzijo prehajajo membrano lizosomov. Ko se akumulirajo v lumnu lizosoma, se protonirajo in kot nabite molekule ne morejo več prosto prehajati v citosol. V to skupino spada npr. klorokin. Podskupina lizosomotropičnih spojin so lizosomotropični detergenti, ki se akumulirajo v lumnu lizosoma ali pa na lizosomski membrani, povzročijo naluknjanje lizosomske membrane in izliv vsebine v citosol (Repnik in sod., 2013; Villamil Giraldo in sod., 2014).

Najpogostejše uporabljeni sintetični lizosomski detergent je LLOMe, ki je bil prvič opisan leta 1990. LLOMe naj bi v celice vstopil z endocitozo in se akumuliral v lizosomih. V prisotnosti

katepsina C, ki ima transferazno aktivnost, naj bi tvoril oligomerne verige. Nastali oligomeri naj bi imeli zaradi hidrofobnosti membranolitičen potencial in bi povzročali naluknjane lizosomov (Thiele in Lipsky, 1990). Obseg LMP naj bi bil odvisen od uporabljene koncentracije LLOMe (Cesen in sod., 2012; Maejima in sod., 2013; Repnik in sod., 2012). Prvotno je bilo pokazano, da je bil LLOMe zlasti citotoksičen za celice, bogate s perforinom, zato je bil nadalje vključen tudi v klinične študije. Z njim so želeli odstraniti perforin pozitivne citotoksične T celice in NK celice (angl. natural killer cells) iz alogene limfocitne infuzije pri transplantaciji kostnega mozga. Vendar so bile klinične študije kmalu opuščene zaradi stranskih učinkov, ki so bili povezani s sprožanjem apoptoze v neimunskih celicah (Filicko-O'Hara in sod., 2009; Kirkegaard in Jaattela, 2009). V nedavno objavljeni študiji so opisali mehanizem, kjer LMP, sprožen z LLOMe v celični liniji HeLa, ni zadosten vzvod za celično smrt. Predlagali so, da lahko samo molekule, ki so manjše od 10 kDa, prehajajo skozi novo nastale pore. Katepsini (20–35 kDa) pa ostanejo ujeti v lizosomih, kjer se razgradijo in ne sprožijo celične smrti (Repnik in sod., 2017).

Ker delovanje LLOMe ni bilo popolnoma pojasnjeno, smo v drugem delu doktorske naloge proučevali njegov mehanizem. Najprej smo proučili, kateri izmed celičnih modelov bi bili najbolj ustrezni glede na raven izraženih proteaz. Na podlagi podatkov, pridobljenih na spletni strani Protein Atlas in rezultatov imunodetekcije po prenosu western (tabela 7, slika 29), smo za nadaljnje delo uporabili celične linije U-937, THP-1 in U-87-MG, ki se med seboj razlikujejo glede na raven izraženih katepsinov. Ugotovili smo, da celična linija HeLa ni primerna, ker skoraj nima katepsinov in tudi sicer zelo slabo dovzetna za sprožanje celične smrti z lizosomotropikom LLOMe (Droga-Mazovec in sod., 2008).

Znano je, da je učinek neke snovi pogojen z uporabljeno koncentracijo (npr. MSDH lahko sproži apoptozo ali nekrozo; (W. Li in sod., 2000)) in da se celične linije razlikujejo po naboru proteaz, vključenih v celično smrt, zato smo v naši študiji najprej optimizirali koncentracije LLOMe, ki sprožijo celično smrt. Ugotovili smo, da nižje koncentracije LLOMe sprožijo celično smrt po krajšem času pri celicah, ki imajo več katepsina C (U-937 in THP-1), medtem ko so potrebne višje koncentracije LLOMe ter daljši čas inkubacije pri celicah z manj katepsina C (U-87-MG; slika 30A). Podobno kot v prejšnjih študijah (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008; Thiele in Lipsky, 1990) smo tudi mi pokazali, da pride do aktivacije kaspaz v odvisnosti od časa (slika 30B). Razlike v aktivnosti med posameznimi celičnimi modeli pa bi lahko bile posledica različne količine kaspaz v celicah. Da bi opredelili vlogo katepsinov in kaspaz v celični smrti, sproženi z LLOMe, smo v poskusih uporabili različne inhibitorje. Dodatek GlyPheDMK, ki je specifičen inhibitor katepsina C (Guay in sod., 2010), je popolnoma preprečil celično smrt (slika 30C). To je v skladu s minulimi raziskavami, ki opisujejo, da LLOMe pridobi membranolitično sposobnost šele po polimerizaciji s pomočjo katepsina C (Thiele in Lipsky, 1990; Uchimoto in sod., 1999). Prav tako so Lima in sodelavci pokazali, da v celičnem modelu makrofagov z izbitim genom za katepsin C ne pride do povečanja števila mrtvih celic po tretiranju z LLOMe v primerjavi z divjim tipom (Lima in sod., 2013). Po uporabi splošnega inhibitorja katepsinov E64d in inhibitorja kaspaz zVAD smo zaznali pozitiven učinek na preživetje celic (slika 31). Pozitiven vpliv dodatka E64d (20 μ M; 2 h pred sprožilcem) na preživetje celic, tretiranih z LLOMe, je najverjetneje posledica inhibicije polimerizacije LLOMe s pomočjo katepsina C in ne inhibicije ostalih cisteinskih katepsinov (Rozman-Pungercar in sod., 2003). V prid temu je tudi dejstvo, da je inhibitor cisteinskih katepsinov E64d v nižjih koncentracijah in po krajšem času tretiranja (5 μ M; 30 min pred sprožilcem) imel slabši zaščitni učinek na preživetje celic (rezultati niso prikazani). Pozitiven učinek pankaspaznega inhibitorja zVAD pa je bil ravno tako pričakovani, saj smo pokazali, da pride v vseh celičnih modelih do aktivacije kaspaz v odvisnosti od časa. S tem smo potrdili, da imajo po tretiranju z LLOMe katepsini pomembno vlogo pri sprožanju celične smrti, kaspaze pa so najverjetneje vršilci smrti.

V lumnu lizosomov so prisotni številni hidrolitični encimi, ki se po poškodbi lizosomske membrane sprostijo v citosol in lahko poškodujejo celico. Njihov vpliv pa je odvisen od stopnje LMP (Aits in Jaattela, 2013; Boya in Kroemer, 2008). Kot smo pokazali v prejšnjih poskusih, smo lahko celično smrt učinkovito preprečili z inhibitorji katepsinov ali kaspaz (slika 30, slika 31). V naslednjem koraku smo preverili, ali so lizosomi glavna tarča LLOMe in če je takojšnje naluknjane lizosomske membrane ključni dogodek. Po barvanju z akridin oranžem, ki se uporablja za spremljanje poškodb lizosomov (Repnik, Cesen, in sod., 2016b; Repnik, Hafner Cesen, in sod., 2016), smo opazili upad v intenziteti fluorescence že 30 minut po dodatku LLOMe v primerjavi z netretiranimi vzorci (slika 32A). V primeru uporabe GlyPheDMK pa smo takojšnji dvig pH kislih veziklov preprečili, saj ni prišlo do tvorbe LLOMe oligomernih verig (slika 32B). E64d je prav tako kot celično smrt učinkovito preprečil tudi LMP, medtem ko je zVAD kazal minimalni zaščitni učinek (slika 33). Ti rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je zVAD dober inhibitor kaspaz in slab inhibitor cisteinskih katepsinov, najpomembnejše katepsina C (Rozman-Pungercar in sod., 2003; Schotte in sod., 1999). Glede na rezultate lahko zaključimo, da najprej

katapsin C polimerizira LLOMe in nastali oligomeri sprožijo LMP. Lizosomske proteaze prehajajo v citosol skozi novonastale pore v lizosomskih membranah in sprožijo aktivacijo kaspaz, ki izvršijo celično smrt.

Nekateri poročajo, da pride do iztoka katapsinov iz poškodovanih lizosomov (Maejima in sod., 2013) in da ti zatem sprožijo kaskado dogodkov, ki vodijo v celično smrt (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008). Po drugi strani Repnik in sodelavci prikazujejo nasprotujoče si rezultate. LLOMe naj bi kljub uporabi visokih koncentracij (do 5 mM LLOMe) sprožila nastanek por, ki pa naj ne bi bile zadostne za prehajanje katapsinov v citosol. Oligomeri LLOMe naj bi se vezali neposredno na katapsine in posledično naj bi prišlo do destabilizacije, razvite hidrolaze pa bi se potem razgradile (Repnik in sod., 2017). V naši študiji smo na različnih celičnih modelih pokazali, da LLOMe povzroči iztok katapsinov v citosol, pred tem pa pride do dviga pH kislih veziklov, ki mu sledi LMP. Za določitev, ali spojina deluje kot lizosomotropični detergent, je ključno merjenje katapsinske aktivnosti v citosolu (Repnik, Cesen, in sod., 2016a). Luknje v membrani lizosomov morajo biti dovolj velike, da omogočijo izhod katapsinov v citosol, in tako lahko nato izmerimo katapsinsko aktivnost v supernatantu. Meritve smo opravili v lizatih brez celic, saj bi lahko sicer dobili neustrezne rezultate, ker bi manjše luknje omogočile vstop sintetičnega substrata zFR-AMC, velikega 600 Da, v lizosom (Repnik, Cesen, in sod., 2016a). Najprej smo določili ustrezno koncentracijo digitonina za pripravo citosolnih in totalnih lizotov, da smo lahko spremljali iztok katapsinov v citosol, ne da bi pri tem dodatno poškodovali lizosome (slika 34). Z merjenjem katapsinske aktivnosti in zaznavanjem izbranih proteinov z imunodetekcijo smo določili, da je koncentracija digitonina 75 µg/ml bolj primerna za pripravo citosolnih lizotov kot 30 µg/ml, ki je bila uporabljena v drugih študijah (Repnik in sod., 2017). Za pripravo totalnih celičnih lizotov pa smo izbrali 400 µg/ml digitonina, saj smo tako dosegli popolno lizo celic (slika 34) in zadostili pogojem, ki so opisani v protokolu za spremljanje permeabilizacije lizosomske membrane na celičnem modelu U-87-MG (Repnik, Cesen, in sod., 2016a, 2016b).

Naši rezultati, ki temeljijo na podlagi natančnih meritev aktivnosti in imunodetekcije katapsinov po prenosu western, kažejo, da LLOMe povzroči iztok katapsinov v aktivni obliki v citosol (slika 35; slika 36), kar je v skladu z objavljenimi raziskavami (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008; Maejima in sod., 2013). Pokazali smo, da pride do obširne destabilizacije lizosomov in masovnega iztoka katapsinov v citosol, saj sta bili citosolna in popolna aktivnost po 15-minutnem dodatku LLOMe primerljivi. V primeru predhodnega dodajanja GlyPheDMK pa nismo zaznali katapsinske aktivnosti v citosolnih lizatih, kar je posledica inhibicije polimerizacije LLOMe v membranolitične oligomere. Ker pa uporabljeni substrat zFR-AMC cepijo številni cisteinski katapsini, nismo uspeli določiti, kateri izmed katapsinov največ prispeva k zaznani aktivnosti (Ivanova in sod., 2008).

Katapsini B, L, S in C so bili sproščeni v citosol po dodatku LLOMe, vendar jih nismo zaznali v citosolnih lizatih netretiranih celic ali celic s predhodno dodanim inhibitorjem katapsina C (slika 35). S tem smo v vseh treh celičnih linijah dokazali, da molekule, večje kot 10 kDa, prehajajo iz lizosomov v citosol in da ne pride do razgradnje katapsinov (slika 35; slika 36). Naši rezultati so tako v nasprotju s študijo, kjer predlagajo, da LLOMe povzroči nastanek por, skozi katere lahko prehajajo le molekule, manjše od 10 kDa, večje molekule, kot so proteaze, pa naj bi ostale znotraj lizosomov in se tam razgradile (Repnik in sod., 2017).

V študiji smo uporabili mišji model z izbitim genom za stefin B, da bi lahko spremljali vpliv na procese, kamor so vključeni cisteinski katapsini po iztoku iz lizosomov. Naši podatki so v skladu z že objavljenimi študijami na enakem mišjem modelu, kjer je bilo pokazano, da so bile celice z izbitim genom za stefin B bolj občutljive na LLOMe kot celice divjega tipa (slika 37), saj v primeru odsotnosti stefina B ni bilo inhibitorja, ki bi lahko omejil aktivnost sproščenih cisteinskih katapsinov in posledično celično smrt (Butinar in sod., 2014). Stefin B je namreč endogeni inhibitor cisteinskih katapsinov, zlasti katapsina L, S in H, nima pa vpliva na eksopeptidaze, kamor prištevamo katapsin C. Primarno se nahaja v citosolu in celice ščiti pred neželeno proteolizo zaradi uhajanja katapsinov iz lizosomov (Keppler, 2006).

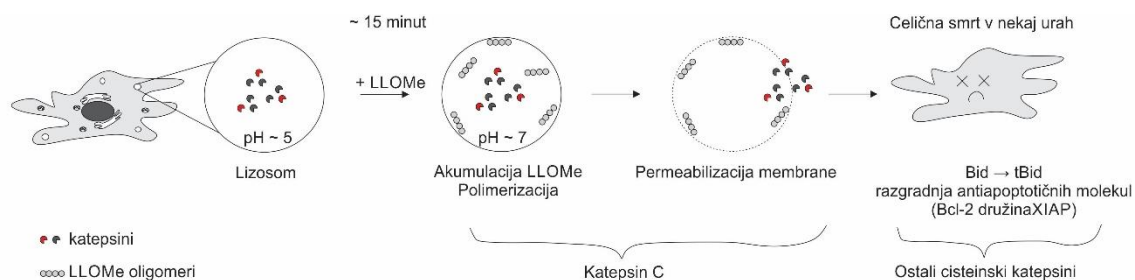
Ko smo 2 uri pred LLOMe dodali še GlyPheDMK, je ostala viabilnost enaka kot v netretiranih vzorcih, kar nakazuje, da imajo cisteinski katapsini pomembno vlogo pri celični smrti, sproženi z LLOMe. Prav tako smo pokazali, da je inhibitor katapsina C znižal vpliv LLOMe na poškodbe lizosomov. Kljub vsemu GlyPheDMK ni popolnoma preprečil LMP, ampak je zgolj zavrl aktivnost katapsina C do te mere, da so bile nastale pore manjše in je bilo prehajanje večjih molekul iz lizosomov onemogočeno. To smo potrdili z merjenjem aktivnosti in imunodetekcijo cisteinskih katapsinov. Iz rezultatov je razvidno, da pride do destabilizacije lizosomov z LLOMe in posledično iztekanja hidrolaz v citosol. Z uporabo GlyPheDMK pa smo potrdili vpletenost katapsina C v sprožitveno fazo celične smrti (slika 37).

Cisteinska katepsina B in L sta primarno vpletena v celično smrt (Guicciardi in sod., 2001; Nagaraj in sod., 2006; Welss in sod., 2003). Čeprav so lizosomski katepsini aktivni v kislem pH in z zviševanjem pH postanejo manj stabilni, so krajši čas aktivni tudi v nevtralnem pH (B. Turk in sod., 2002). Zato ni bilo presenetljivo, da smo v celicah z izbitima genom za oba cisteinska katepsina B in L izmerili nižji odstotek celične smrti v primerjavi z vzorcem divjega tipa (slika 38). Ti podatki so v skladu z objavljeno študijo na mišjem modelu raka mlečne žleze z izbitim genom za katepsin B. Celice brez katepsina B so bile manj občutljive na sprožitev celične smrti z LLOMe (Vasiljeva in sod., 2006), ker naj bi se manj Bid pretvorilo v tBid (Blomgran in sod., 2007; Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008). Nekatere študije pa so prikazale, da izbitje posameznega gena za katepsin B ali L ne prepreči celične smrti, sprožene z LLOMe. Inhibitor CA-074-Me pa je učinkovito preprečil celično smrt kot posledico destabilizacije lizosomov (Brojatsch in sod., 2015; Lima in sod., 2013). Iz literature je znano, da je CA-074-Me zelo dober inhibitor katepsina B, vendar v določeni meri inhibira še druge cisteinske katepsine, kot sta katepsina L in S (Bogyo in sod., 2000; Rozman-Pungercar in sod., 2003), kar dodatno potrjuje naše rezultate. Kljub vsemu pa lahko sklepamo, da katepsina B in L nista edina potrebna za sprožitev apoptoze preko cepitve Bid in razgradnjo antiapoptotskih homologov Bcl-2, ampak lahko njuno vlogo prevzamejo tudi drugi katepsini, npr. katepsin S (Cirman in sod., 2004). To smo posredno pokazali tudi z uporabo celic U-937 in THP-1, ki nimajo prisotnega katepsina B in L, ampak imajo v višjih koncentracijah zastopan katepsin S (tabela 7; slika 29).

V naši študiji smo nakazali, da LLOMe povzroči tudi oksidativni stres, saj smo zaznali nastanek ROS v odvisnosti od časa (slika 39). Rezultati kažejo, da nastanejo ROS po povišanju lizosomskega pH in iztok katepsinov ter prosto dostopni železovi ioni dodatno pripomorejo k povišanju oksidativnega stresa. Železovi ioni vstopijo v Fentonovo reakcijo, kjer iz vodikovega peroksida nastane hidroksilni radikal (Terman in Kurz, 2013). Znano je, da bi v primeru oksidativnega stresa delovanje lizosomov lahko ohranili z dodajanjem nekaterih vitaminov in povišano aktivnostjo encimov katalaze, superoksid dismutaze in glutation peroksidaze. V našem primeru smo uporabili hidrofilni antioksidant NAC, ki pa ni kazal zaščitnega učinka, saj ni preprečil nastanka ROS, kar bi lahko bilo posledica omejenega učinka v kislem pH. Na podlagi teh rezultatov smo sklepali, da ROS nimajo odločilne vloge pri celični smrti, sproženi z LLOMe, ampak le ojačajo signaliziranje. Najverjetneje povzročijo peroksidacijo kardioplipina, ki je povezana z iztokom citokroma C iz mitohondrijev (M. Ghosh in sod., 2011; Kagan in sod., 2005). Poleg tega je peroksidacija lipidnih membran povezana s strukturnimi spremembami lipidnih dvoslojev, saj vpliva na pretok ionov, zmanjša se fluidnost membran in poveča se njihova propustnost, kar omejuje normalno delovanje različnih celičnih organelov in lahko vodi v smrt (Feng in Stockwell, 2018; Terman in Kurz, 2013).

V naši študiji smo pokazali, da se začne kopičiti LC3 II po tretiranju z LLOMe (slika 40). Naluknjane lizosomov naj bi sprožilo avtofagijo, kar je v skladu z ugotovitvami Maejima in sod. (Maejima in sod., 2013), ki so pokazali, da so poškodovani lizosomi odstranjeni z avtofagijo. Kopičenje LC3 II pa bi lahko bilo tudi posledica inhibirane avtofagije zaradi spremenjenega pH lizosomov in izlitja hidrolaz v citosol. Slednje je veliko bolj verjetno pojasnilo, saj bi v primeru lizofagije celice preživele, medtem ko se v naših meritvah preživetje znižuje (J. Zhang, 2015; L. Zhang in sod., 2015). Zaradi dvoumnosti pri razlagi rezultatov za LC3 po prenosu western bi morali naše rezultate še dodatno potrditi z drugimi metodami, kot so: uporaba različnih inhibitorjev avtofagije, spremljanje prisotnosti proteina p62 po prenosu western, spremljanje izražanja in kopičenje konstrukta LC3-GFP-CFP (angl. green fluorescence protein; cherry fluorescence protein) z uporabo fluorescenčne mikroskopije, itd. (Anding in Baehrecke, 2017; Klionsky in sod., 2012; Mrschtik in Ryan, 2015; J. Zhang, 2015).

Na podlagi rezultatov lahko trdimo, da LLOMe deluje kot pravi lizosomotropični detergent. Njegovo delovanje lahko razdelimo na več stopenj (slika 42): nastanek membranolitičnih oligomerov LLOMe v prisotnosti aktivnega katepsina C; neselektivno prehajanje katepsinov in ostalih hidrolaz iz lizosomov skozi nastale pore; in nazadnje aktivacija kaspaz, v kar so najverjetneje vključeni mitohondrijski proteini (Bid se pretvori v tBid v prisotnosti katepsinov, razgradijo se antiapoptotične molekule iz družine Bcl-2). Slednje bi lahko še dodatno potrdili v nadaljevanju raziskave. Lizosomski katepsini imajo tako pomembno vlogo predvsem v iniciacijskem procesu (signaliziranja) apoptoze, medtem ko izvršitveno vlogo odigrajo kaspaze.



Slika 42: Shema mehanizma delovanja LLOMe. Ko so celice izpostavljene lizosomotropičnemu detergentu LLOMe, se le-ta prične akumulirati v lizosomih, poviša se pH. Katepsin C pripomore k polimerizaciji LLOMe. Polimeri LLOMe imajo membranolitične lastnosti in posledično pride do permeabilizacije lizosomske membrane. Katepsini se izlijejo v citosol in v nekaj urah povzročijo celično smrt.

Zaključki

Doktorska disertacija prinaša nova spoznanja o vlogi oksidativnega stresa v različnih oblikah celične smrti. Pokazali smo, da pride do povišanja ROS v štirih različnih modelih celične smrti: nekrozi, intrinzični in ekstrinzični apoptozi ter nekroptози. Z uporabo različnih eksogenih antioksidantov (NAC, α TOC, MnTBAP in Tempol) smo dopolnili celični antioksidacijski sistem in vsaj delno omejili oksidativni stres, neodvisno od sprožilca celične smrti. Kljub vsemu z uporabo antioksidantov nismo uspeli vedno omejiti celične smrti. NAC je kot klasični odstranjevalec ROS v celoti preprečil nekrozo, ki jo je sprožil menadion, drugi izbrani antioksidanti z nevtraliziranjem nastalih ROS niso imeli vpliva na druge oblike celične smrti. Kljub temu je uporaba nekaterih antioksidantov vprašljiva. Tak primer je Tempol, ki je lahko učinkovito preprečil ekstrinzično apoptozo in v nekoliko manjšem obsegu nekroptozo, ki jo povzroča TNF, kljub neželenim učinkom pri višjih koncentracijah. Rezultati nakazujejo, da je to delovanje ločeno od antioksidativnega delovanja.

Na podlagi zbranih rezultatov:

- smo potrdili 1. in 3. hipotezo, da se množina sproščenih ROS med različnimi oblikami celične smrti razlikuje in da imajo ROS pomembno vlogo signalnih molekul v klasični nekrozi;
- z uporabo antioksidantov intrinzične, ekstrinzične apoptoze in nekroptoze nismo uspeli popolnoma preprečiti, zato ne gre izključiti, da imajo ROS pomembno vlogo pri ojačitvi signala za celično smrt;
- delno smo lahko potrdili tudi 2. hipotezo, saj smo pokazali, da lahko z antioksidanti vplivamo na sprožen oksidativni stres in celično smrt, vendar niso vsi antioksidanti enako učinkoviti, kar je odvisno od njihovega mehanizma delovanja.

Ključna novost doktorske disertacije je primerjava vpliva različnih sprožilcev celične smrti na oksidativni stres v izbranih celičnih modelih ter primerjava izbranih antioksidantov. Na podlagi naših dognanj je potrebno poudariti, da je pri uporabi antioksidantov bodisi v raziskovalne ali terapevtske namene potrebno upoštevati njihov mehanizem delovanja, uporabo ustrezne koncentracije in zvrst nastalih ROS, ki jo želimo nevtralizirati. Poleg tega smo izpostavili, da nekatere učinkovine nimajo samo antioksidativnih lastnosti, ampak lahko vplivajo na delovanje celice tudi drugače; tak primer je Tempol, katerega natančen mehanizem delovanja še ni popolnoma pojasnjen.

Doktorska disertacija nadalje prinaša nova spoznanja o mehanizmu in vlogi katepsinov v celični smrti, sproženi z lizosomotropičnim detergentom LLOMe. Z uporabo celičnih linij, ki vsebujejo različne koncentracije posameznih katepsinov, smo pokazali, da inkubacija celic z LLOMe vodi do hitrega povišanja lizosomskega pH, ki je začetna točka LMP. LMP je običajno točka brez povratka, za katero sta značilna iztekanje lizosomskih hidrolaz v citosol in kasnejša celična smrt. Selektivni zaviralec katepsina C, GlyPheDMK, je učinkovito preprečil zvišanje lizosomskega pH in celično smrt. Nasprotno pa je splošni zaviralec katepsinov, E64d, preprečil samo celično smrt, vendar le delno ohranil normalen lizosomski pH, pan-kaspazni inhibitor pa ni imel tako močnega vpliva. Z uporabo primarnih celic PyMT z izbitim genom za glavni citosolni inhibitor katepsinov, stefin B, in celic MEF, ki so imele izbitje genov za katepsina B in L, smo potrdili, da je katepsin C potreben za iztok lizosomskih katepsinov v citosol. Sproščeni katepsini pa v naslednjem koraku sprožijo od kaspaz odvisno celično smrt. Odstopanja pri občutljivosti celic na LLOMe so verjetno posledica različnega izražanja katepsinov, stefina B, pa tudi drugih pro- in anti-apoptotičnih proteinov, vključno z Bcl-2 homologi, ali pa je to posledica, med drugim, razlik v sestavi membrane organelov ter plazemske membrane in sposobnosti endocitiranja.

Na podlagi rezultatov smo potrdili hipotezo, da katepsin C v lizosomih s povišanim pH polimerizira LLOMe, ki pridobi membranolitične lastnosti. Zaradi destabilizacije lizosomske membrane pride do sproščanja lizosomskih hidrolaz in s cisteinskimi katepsini posredovane izvršitve intrinzične apoptoze.

Ključna novost je določitev vloge cisteinskih katepsinov v celični smrti sproženi z lizosomotropičnim detergentom LLOMe. Poleg tega smo izpostavili pomembnost izbire ustreznega modela za proučevanje delovanja LLOMe in posledično interpretacije rezultatov analiz lizosomske integritete. Ker imajo lizosomotropični detergenti terapevtski potencial, je natančno poznavanje njihovega mehanizma delovanja izrednega pomena.

Literatura

- Ahmed, L. A., Shehata, N. I., Abdelkader, N. F., & Khattab, M. M. (2014). Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PLoS One*, 9(10), e108889. doi: 10.1371/journal.pone.0108889
- Aits, S., & Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci*, 126(Pt 9), 1905-1912.
- Alenzi, F. Q., Lotfy, M., & Wyse, R. (2010). Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 11(2), 271-280.
- Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2017). Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell*, 41(1), 10-22. doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.016
- Appelmans, F., Wattiaux, R., de Duve, D. (1955). Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J*, 59(3), 438-445.
- Appelqvist, H., Waster, P., Kagedal, K., & Ollinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol*, 5(4), 214-226.
- Arias, E., & Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol*, 23(2), 184-189.
- Arya, R., & White, K. (2015). Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, 39, 12-19. doi: 10.1016/j.semedb.2015.02.001
- Bakker, M. F., Peeters, P. H., Klaasen, V. M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Jansen, E. H., Ros, M. M., . . . van Gils, C. H. (2016). Plasma carotenoids, vitamin C, tocopherols, and retinol and the risk of breast cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin Nutr*, 103(2), 454-464. doi: 10.3945/ajcn.114.101659
- Baran, I., Ganea, C., Scordino, A., Musumeci, F., Barresi, V., Tudisco, S., . . . Ursaciuc, C. (2010). Effects of menadione, hydrogen peroxide, and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem Biophys*, 58(3), 169-179. doi: 10.1007/s12013-010-9104-1
- Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav*, 4(2), 108-122. doi: 10.1002/brb3.208
- Blomgran, R., Zheng, L., & Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol*, 81(5), 1213-1223.
- Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci*, 41(3), 274-286.
- Bogyo, M., Verhelst, S., Bellingard-Dubouchaud, V., Toba, S., & Greenbaum, D. (2000). Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem Biol*, 7(1), 27-38.
- Bortner, C. D., & Cidlowski, J. A. (2014). Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1638), 20130104. doi: 10.1098/rstb.2013.0104
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4), 228-237. doi: 10.4161/oxim.3.4.12858
- Bourassa MG, T. J.-C. (Ed.). (2006). *Antioxidants and cardiovascular disease* (2nd ed.). New York: Springer.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J. L., Metivier, D., . . . Kroemer, G. (2003). Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med*, 197(10), 1323-1334. doi: 10.1084/jem.20021952

- Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H. L., Roumier, T., . . . Kroemer, G. (2003). Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, 22(25), 3927-3936. doi: 10.1038/sj.onc.1206622
- Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27(50), 6434-6451. doi: 10.1038/onc.2008.310
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, 45(7-8), 466-472. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Jr., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, w13659. doi: 10.4414/smw.2012.13659
- Brojatsch, J., Lima, H., Jr., Palliser, D., Jacobson, L. S., Muehlbauer, S. M., Furtado, R., . . . Chandran, K. (2015). Distinct cathepsins control necrotic cell death mediated by pyroptosis inducers and lysosome-destabilizing agents. *Cell Cycle*, 14(7), 964-972.
- Butinar, M., Prebanda, M. T., Rajkovic, J., Jeric, B., Stoka, V., Peters, C., . . . Vasiljeva, O. (2014). Stefin B deficiency reduces tumor growth via sensitization of tumor cells to oxidative stress in a breast cancer model. *Oncogene*, 33(26), 3392-3400. doi: 10.1038/onc.2013.314
- Cabal-Hierro, L., & Lazo, P. S. (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*, 24(6), 1297-1305. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006
- Caglic, D., Pungercar, J. R., Pejler, G., Turk, V., & Turk, B. (2007). Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem*, 282(45), 33076-33085. doi: 10.1074/jbc.M705761200
- Cauwels, A., Rogge, E., Janssen, B., & Brouckaert, P. (2010). Reactive oxygen species and small-conductance calcium-dependent potassium channels are key mediators of inflammation-induced hypotension and shock. *J Mol Med (Berl)*, 88(9), 921-930. doi: 10.1007/s00109-010-0633-2
- Cesen, M. H., Pegan, K., Spes, A., & Turk, B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*, 318(11), 1245-1251.
- Cesen, M. H., Repnik, U., Turk, V., & Turk, B. (2013). Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes. *Cell Death Dis*, 4, e818.
- Chaitanya, G. V., Steven, A. J., & Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*, 8, 31.
- Chen, Y., & Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 124(Pt 2), 161-170. doi: 10.1242/jcs.064576
- Cheng, T., van Vlijmen-Willems, I. M., Hitomi, K., Pasch, M. C., van Erp, P. E., Schalkwijk, J., & Zeeuwen, P. L. (2009). Colocalization of cystatin M/E and its target proteases suggests a role in terminal differentiation of human hair follicle and nail. *J Invest Dermatol*, 129(5), 1232-1242.
- Cho, S. Y., Lee, J. H., Ju, M. K., Jeong, E. M., Kim, H. J., Lim, J., . . . Kim, I. G. (2015). Cystamine induces AIF-mediated apoptosis through glutathione depletion. *Biochim Biophys Acta*, 1853(3), 619-631. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.028
- Ciechanover, A. (2012). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 3-13.
- Cildir, G., Low, K. C., & Tergaonkar, V. (2016). Noncanonical NF-kappaB Signaling in Health and Disease. *Trends Mol Med*, 22(5), 414-429. doi: 10.1016/j.molmed.2016.03.002
- Cirman, T., Oresic, K., Mazovec, G. D., Turk, V., Reed, J. C., Myers, R. M., . . . Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem*, 279(5), 3578-3587.
- Connolly, P. F., Jager, R., & Fearnhead, H. O. (2014). New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol*, 5, 149. doi: 10.3389/fphys.2014.00149
- Costanzo, A., Fausti, F., Spallone, G., Moretti, F., Narcisi, A., & Botti, E. (2015). Programmed cell death in the skin. *Int J Dev Biol*, 59(1-3), 73-78.

- Cuervo, A. M. (2004a). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 14(2), 70-77. doi: 10.1016/j.tcb.2003.12.002
- Cuervo, A. M. (2004b). Autophagy: Many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*, 263(1), 55-72. doi: 10.1023/B:MCBI.0000041848.57020.57
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 49-63. doi: 10.1038/nrm3722
- Daiber, A. (2010). Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7), 897-906. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.032
- Das, G., Shrivage, B. V., & Baehrecke, E. H. (2012). Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6). doi: 10.1101/cshperspect.a008813
- de Almagro, M. C., Goncharov, T., Izrael-Tomasevic, A., Duttler, S., Kist, M., Varfolomeev, E., . . . Vucic, D. (2017). Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. *Cell Death Differ*, 24(1), 26-37. doi: 10.1038/cdd.2016.78
- de Almagro, M. C., Goncharov, T., Newton, K., & Vucic, D. (2015). Cellular IAP proteins and LUBAC differentially regulate necrosome-associated RIP1 ubiquitination. *Cell Death Dis*, 6, e1800. doi: 10.1038/cddis.2015.158
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci Am*, 208, 64-72.
- de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur J Biochem*, 137(3), 391-397.
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28, 435-492. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., . . . Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*, 4(5), 313-321. doi: 10.1038/nchembio.83
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., . . . Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, 1(2), 112-119. doi: 10.1038/nchembio711
- Degterev, A., & Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 378-390. doi: 10.1038/nrm2393
- Delbridge, A. R., Grabow, S., Strasser, A., & Vaux, D. L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 16(2), 99-109. doi: 10.1038/nrc.2015.17
- Denton, D., Nicolson, S., & Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ*, 19(1), 87-95. doi: 10.1038/cdd.2011.146
- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., & MacFarlane, M. (2012). The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res*, 318(11), 1269-1277. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.04.005
- Ding, W. X., Ni, H. M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D. B., Ron, D., & Yin, X. M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*, 171(2), 513-524. doi: 10.2353/ajpath.2007.070188
- Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol*, 10(1), 9-17.
- Dondelinger, Y., Darding, M., Bertrand, M. J., & Walczak, H. (2016). Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Mol Life Sci*, 73(11-12), 2165-2176. doi: 10.1007/s00018-016-2191-4
- Dondelinger, Y., Jouan-Lanhuet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, P. J., . . . Bertrand, M. J. (2015). NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Mol Cell*, 60(1), 63-76. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.032

- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., . . . Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem*, 283(27), 19140-19150.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., & Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3471-3480.
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 16(6), 663-669. doi: 10.1016/j.ceb.2004.09.011
- Elbini Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., & Lasram, M. M. (2016). A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci*, 151, 359-363. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.003
- Eskelinen, E. L., & Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1793(4), 664-673.
- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171(8), 2000-2016. doi: 10.1111/bph.12416
- Feng, H., & Stockwell, B. R. (2018). Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biol*, 16(5), e2006203. doi: 10.1371/journal.pbio.2006203
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18(54), 7719-7730. doi: 10.1038/sj.onc.1203249
- Filicko-O'Hara, J., Grosso, D., Flomenberg, P. R., Friedman, T. M., Brunner, J., Drobyski, W., . . . Flomenberg, N. (2009). Antiviral responses following L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLME)-treated lymphocyte infusions: graft-versus-infection without graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15(12), 1609-1619.
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 22(3), 377-388. doi: 10.1038/cdd.2014.150
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Valentine, J. S. (2016). How did life survive Earth's great oxygenation? *Curr Opin Chem Biol*, 31, 166-178. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.03.013
- Fonovic, M., & Turk, B. (2014). Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl*, 8(5-6), 416-426. doi: 10.1002/prca.201300085
- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822(9), 1363-1373. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.001
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.033
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., . . . Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*, 36(13), 1811-1836. doi: 10.15252/embj.201796697
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci*, 73(11-12), 2405-2410. doi: 10.1007/s00018-016-2209-y
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., & Kroemer, G. (2014). Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol*, 16(8), 728-736.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Levine, B., Green, D. R., & Kroemer, G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 16(7), 487-511. doi: 10.1038/nrd.2017.22
- Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microb Cell*, 3(3), 101-108. doi: 10.15698/mic2016.03.483
- Galluzzi, L., Lopez-Soto, A., Kumar, S., & Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity*, 44(2), 221-231. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.020

- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3), 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., . . . Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19(1), 107-120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- Gao, X., & Schottker, B. (2017). Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*, 8(31), 51888-51906. doi: 10.18632/oncotarget.17128
- Georgakilas, A. G., Redon, C. E., Ferguson, N. F., Kryston, T. B., Parekh, P., Dickey, J. S., . . . Martin, O. A. (2014). Systemic DNA damage accumulation under in vivo tumor growth can be inhibited by the antioxidant Tempol. *Cancer Lett*, 353(2), 248-257. doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.030
- Ghosh, M., Carlsson, F., Laskar, A., Yuan, X. M., & Li, W. (2011). Lysosomal membrane permeabilization causes oxidative stress and ferritin induction in macrophages. *FEBS Lett*, 585(4), 623-629.
- Ghosh, S., & Dass, J. F. (2016). Study of pathway cross-talk interactions with NF-kappaB leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene*, 584(1), 97-109. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.008
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684. doi: 10.1038/sj.onc.1209954
- Gomez-Sintes, R., Ledesma, M. D., & Boya, P. (2016). Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Res Rev*.
- Goossens, V., Stange, G., Moens, K., Pipeleers, D., & Grooten, J. (1999). Regulation of tumor necrosis factor-induced, mitochondria- and reactive oxygen species-dependent cell death by the electron flux through the electron transport chain complex I. *Antioxid Redox Signal*, 1(3), 285-295. doi: 10.1089/ars.1999.1.3-285
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629. doi: 10.1126/science.1099320
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(12). doi: 10.1101/cshperspect.a006080
- Green, D. R., Oguin, T. H., & Martinez, J. (2016). The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ*, 23(6), 915-926. doi: 10.1038/cdd.2015.172
- Guay, D., Beaulieu, C., & Percival, M. D. (2010). Therapeutic utility and medicinal chemistry of cathepsin C inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 10(7), 708-716.
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J*, 23(6), 1625-1637. doi: 10.1096/fj.08-111005
- Guicciardi, M. E., Miyoshi, H., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2001). Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol*, 159(6), 2045-2054.
- Guo, X., Chen, S., Zhang, Z., Dobrovolsky, V. N., Dial, S. L., Guo, L., & Mei, N. (2015). Reactive oxygen species and c-Jun N-terminal kinases contribute to TEMPO-induced apoptosis in L5178Y cells. *Chem Biol Interact*, 235, 27-36. doi: 10.1016/j.cbi.2015.04.009
- Hafner Cesen, M., Stoka, V., & Turk, B. (2016). Role of lysosomes in intracellular degradation *Encyclopedia of cell biology* (Vol. 1).
- Hahn, S. M., Tochner, Z., Krishna, C. M., Glass, J., Wilson, L., Samuni, A., . . . et al. (1992). Tempol, a stable free radical, is a novel murine radiation protector. *Cancer Res*, 52(7), 1750-1753.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol*, 26(3), 253-266. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004

- 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- α . *Cell*, 137(6), 1100-1111. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021
- Henke, N., Albrecht, P., Bouchachia, I., Ryazantseva, M., Knoll, K., Lewerenz, J., . . . Methner, A. (2013). The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis*, 4, e470.
- Hinz, M., & Scheidereit, C. (2014). The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep*, 15(1), 46-61. doi: 10.1002/embr.201337983
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., . . . Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, 1(6), 489-495. doi: 10.1038/82732
- Hu, Y. B., Dammer, E. B., Ren, R. J., & Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener*, 4, 18.
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*, 30(17), 3481-3500. doi: 10.1038/emboj.2011.286
- Ivanova, S., Repnik, U., Bojic, L., Petelin, A., Turk, V., & Turk, B. (2008). Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol*, 442, 183-199. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01409-2
- Jarvis, R. M., Gottert, J., Murphy, M. P., & Ledgerwood, E. C. (2007). Mitochondria-targeted antioxidants do not prevent tumour necrosis factor-induced necrosis of L929 cells. *Free Radic Res*, 41(9), 1041-1046. doi: 10.1080/10715760701557153
- Jiang, J., Maeda, A., Ji, J., Baty, C. J., Watkins, S. C., Greenberger, J. S., & Kagan, V. E. (2011). Are mitochondrial reactive oxygen species required for autophagy? *Biochem Biophys Res Commun*, 412(1), 55-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.036
- Jouan-Lanhuet, S., Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., . . . Dimanche-Boitrel, M. T. (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ*, 19(12), 2003-2014. doi: 10.1038/cdd.2012.90
- Jouan-Lanhuet, S., Riquet, F., Duprez, L., Vanden Berghe, T., Takahashi, N., & Vandenabeele, P. (2014). Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Dev Biol*, 35, 2-13. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.010
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., . . . Borisenko, G. G. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, 1(4), 223-232. doi: 10.1038/nchembio727
- Kaludercic, N., Deshwal, S., & Di Lisa, F. (2014). Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol*, 5, 285. doi: 10.3389/fphys.2014.00285
- Kaminsky, V., & Zhivotovsky, B. (2012). Proteases in autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 44-50.
- Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, 21(1), 86-102. doi: 10.1089/ars.2013.5746
- Kato, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2018). Overview of the mechanism of cytoskeletal motors based on structure. *Biophys Rev*, 10(2), 571-581. doi: 10.1007/s12551-017-0368-1
- Katsnelson, M. A., Lozada-Soto, K. M., Russo, H. M., Miller, B. A., & Dubyak, G. R. (2016). NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx. *Am J Physiol Cell Physiol*, 311(1), C83-C100. doi: 10.1152/ajpcell.00298.2015
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(8), 461-472.
- Kavcic, N., Pegan, K., & Turk, B. (2016). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifiers. *Biol Chem*. doi: 10.1515/hsz-2016-0252
- 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(4), 239-257.
- Kim, K. H., & Lee, M. S. (2014). Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 10(6), 322-337. doi: 10.1038/nrendo.2014.35

- Kim, P. K., Hailey, D. W., Mullen, R. T., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), 20567-20574. doi: 10.1073/pnas.0810611105
- Kimmelman, A. C. (2011). The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 25(19), 1999-2010.
- Kirkegaard, T., & Jaattela, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1793(4), 746-754.
- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., . . . Zuckerbraun, B. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8(4), 445-544.
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497), 1717-1721.
- Kottschade, L. A., Sloan, J. A., Mazurczak, M. A., Johnson, D. B., Murphy, B. P., Rowland, K. M., . . . Loprinzi, C. L. (2011). The use of vitamin E for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: results of a randomized phase III clinical trial. *Support Care Cancer*, 19(11), 1769-1777. doi: 10.1007/s00520-010-1018-3
- Kramer, L., Turk, D., & Turk, B. (2017). The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci*, 38(10), 873-898. doi: 10.1016/j.tips.2017.06.003
- Krishna, M. C., Samuni, A., Taira, J., Goldstein, S., Mitchell, J. B., & Russo, A. (1996). Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem*, 271(42), 26018-26025.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., . . . Nomenclature Committee on Cell, D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), 3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150
- Kruglov, A. G., Subbotina, K. B., & Saris, N. E. (2008). Redox-cycling compounds can cause the permeabilization of mitochondrial membranes by mechanisms other than ROS production. *Free Radic Biol Med*, 44(4), 646-656. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.049
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., Parthoens, E., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol*, 442, 307-341. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01416-X
- Kubota, C., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H., & Takeuchi, T. (2010). Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *J Biol Chem*, 285(1), 667-674.
- Kurz, T., Eaton, J. W., & Brunk, U. T. (2011). The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(12), 1686-1697.
- Lamark, T., & Johansen, T. (2010). Autophagy: links with the proteasome. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 192-198. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.002
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(12), 759-774. doi: 10.1038/nrm3696
- Lartigue, L., Kushnareva, Y., Seong, Y., Lin, H., Faustin, B., & Newmeyer, D. D. (2009). Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol Biol Cell*, 20(23), 4871-4884. doi: 10.1091/mbc.E09-07-0649
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441(2), 523-540. doi: 10.1042/BJ20111451
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018

- Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E., & Bartosz, G. (2008). The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, 649(1-2), 7-14. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.07.014
- Li, W., Yuan, X., Nordgren, G., Dalen, H., Dubowchik, G. M., Firestone, R. A., & Brunk, U. T. (2000). Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett*, 470(1), 35-39.
- Li, W. W., Li, J., & Bao, J. K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 69(7), 1125-1136.
- Lima, H., Jr., Jacobson, L. S., Goldberg, M. F., Chandran, K., Diaz-Griffero, F., Lisanti, M. P., & Brojatsch, J. (2013). Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle*, 12(12), 1868-1878.
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *N Engl J Med*, 370(5), 455-465. doi: 10.1056/NEJMr1310050
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., & Declercq, W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis*, 14(4), 549-569.
- Liu, Y., Shoji-Kawata, S., Sumpter, R. M., Jr., Wei, Y., Ginet, V., Zhang, L., . . . Levine, B. (2013). Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), 20364-20371. doi: 10.1073/pnas.1319661110
- Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J. M., Chandel, N. S., Vanden Hoek, T. L., & Schumacker, P. T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 49(12), 1925-1936. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.021
- Lopez, J., & Tait, S. W. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*, 112(6), 957-962. doi: 10.1038/bjc.2015.85
- Lu, W., Sun, J., Yoon, J. S., Zhang, Y., Zheng, L., Murphy, E., . . . Lenardo, M. J. (2016). Mitochondrial Protein PGAM5 Regulates Mitophagic Protection against Cell Necroptosis. *PLoS One*, 11(1), e0147792. doi: 10.1371/journal.pone.0147792
- Luo, Z., Chen, Y., Chen, S., Welch, W. J., Andresen, B. T., Jose, P. A., & Wilcox, C. S. (2009). Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 157(6), 935-943. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00259.x
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 224, 164-175. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., . . . Yoshimori, T. (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J*, 32(17), 2336-2347. doi: 10.1038/emboj.2013.171
- Male, D. (2012). *Immunology* (J. B. David Male, David Roth, Ivan Roitt Ed. 8th ed.). China: Elsevier.
- Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J Mol Biol*, 428(9 Pt A), 1659-1680. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.027
- Mariappan, N., Soorappan, R. N., Haque, M., Sriramula, S., & Francis, J. (2007). TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(5), H2726-2737. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2007
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735
- Martinez-Ruiz, G., Maldonado, V., Ceballos-Cancino, G., Grajeda, J. P., & Melendez-Zajgla, J. (2008). Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*, 27, 48. doi: 10.1186/1756-9966-27-48
- Mattson, M. P., & Furukawa, K. (1997). Anti-apoptotic actions of cycloheximide: blockade of programmed cell death or induction of programmed cell life? *Apoptosis*, 2(3), 257-264.

- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656
- Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., & Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol*, 26(19), 7046-7055. doi: 10.1128/MCB.00520-06
- Metz, J. M., Smith, D., Mick, R., Lustig, R., Mitchell, J., Cherakuri, M., . . . Hahn, S. M. (2004). A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. *Clin Cancer Res*, 10(19), 6411-6417. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0658
- Miller, D. K., Griffiths, E., Lenard, J., & Firestone, R. A. (1983). Cell killing by lysosomotropic detergents. *J Cell Biol*, 97(6), 1841-1851.
- Mizushima, N. (2007). The role of mammalian autophagy in protein metabolism. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 83(2), 39-46.
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741.
- Mohamed, M. S., Bishr, M. K., Almutairi, F. M., & Ali, A. G. (2017). Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, 22(12), 1487-1509. doi: 10.1007/s10495-017-1429-4
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 80, 50-64. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21(1), 103-115. doi: 10.1038/cr.2010.178
- Mrschik, M., & Ryan, K. M. (2015). Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *Febs J*, 282(10), 1858-1870.
- Nagaraj, N. S., Vigneswaran, N., & Zacharias, W. (2006). Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132(3), 171-183. doi: 10.1007/s00432-005-0053-9
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., . . . Franco, R. (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*, 21(1), 66-85. doi: 10.1089/ars.2014.5837
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
- Ofengeim, D., & Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(11), 727-736.
- Offer, T., Russo, A., & Samuni, A. (2000). The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J*, 14(9), 1215-1223.
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*, 24(1), 9-23. doi: 10.1038/cr.2013.169
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922. doi: 10.1007/s10495-007-0756-2
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta*, 1777(10), 1249-1262. doi: 10.1016/j.bbabo.2008.07.003
- Parenti, G., Andria, G., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu Rev Med*, 66, 471-486.
- Park, C., & Cuervo, A. M. (2013). Selective autophagy: talking with the UPS. *Cell Biochem Biophys*, 67(1), 3-13. doi: 10.1007/s12013-013-9623-7
- Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6). doi: 10.1101/cshperspect.a008672
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311-320.

- Platini, F., Perez-Tomas, R., Ambrosio, S., & Tessitore, L. (2010). Understanding autophagy in cell death control. *Curr Pharm Des*, 16(1), 101-113.
- 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. *Biochem J*, 433(3), 447-457. doi: 10.1042/BJ20101738
- Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, 284(33), 21777-21781. doi: 10.1074/jbc.R800084200
- Ransom, J. T., & Reeves, J. P. (1983). Accumulation of amino acids within intracellular lysosomes of rat polymorphonuclear leukocytes incubated with amino acid methyl esters. Evidence for the internal acidification of azurophilic granules. *J Biol Chem*, 258(15), 9270-9275.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., . . . Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90(4), 1383-1435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009
- Redmann, M., Benavides, G. A., Berryhill, T. F., Wani, W. Y., Ouyang, X., Johnson, M. S., . . . Zhang, J. (2017). Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol*, 11, 73-81. doi: 10.1016/j.redox.2016.11.004
- Reggiori, F., & Ungermann, C. (2017). Autophagosome Maturation and Fusion. *J Mol Biol*, 429(4), 486-496. doi: 10.1016/j.jmb.2017.01.002
- Reiser, J., Adair, B., & Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest*, 120(10), 3421-3431. doi: 10.1172/JCI42918
- Repnik, U., Borg Distefano, M., Speth, M. T., Ng, M. Y. W., Progida, C., Hoflack, B., . . . Griffiths, G. (2017). L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes. *J Cell Sci*, 130(18), 3124-3140. doi: 10.1242/jcs.204529
- Repnik, U., Cesen, M. H., & Turk, B. (2013). The endolysosomal system in cell death and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1), a008755. doi: 10.1101/cshperspect.a008755
- Repnik, U., Cesen, M. H., & Turk, B. (2016a). Measuring Cysteine Cathepsin Activity to Detect Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(5), pdb prot087114.
- Repnik, U., Cesen, M. H., & Turk, B. (2016b). The Use of Lysosomotropic Dyes to Exclude Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(5), pdb prot087106.
- Repnik, U., Hafner Cesen, M., & Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. *Mitochondrion*, 19 Pt A, 49-57.
- Repnik, U., Hafner Cesen, M., & Turk, B. (2016). Strategies for Assaying Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(6). doi: 10.1101/pdb.top077479
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 22-33.
- Reubold, T. F., & Eschenburg, S. (2012). A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell Signal*, 24(7), 1420-1425. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.03.007
- Rozman-Pungercar, J., Kopitar-Jerala, N., Bogoyo, M., Turk, D., Vasiljeva, O., Stefe, I., . . . Turk, B. (2003). Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ*, 10(8), 881-888. doi: 10.1038/sj.cdd.4401247
- Rushworth, G. F., & Megson, I. L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther*, 141(2), 150-159. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.006
- Russell, R. C., Yuan, H. X., & Guan, K. L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res*, 24(1), 42-57. doi: 10.1038/cr.2013.166

- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., & Choi, A. M. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 9(1), 49-89. doi: 10.1089/ars.2007.9.49
- Saftig, P., Schroder, B., & Blanz, J. (2010). Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochem Soc Trans*, 38(6), 1420-1423.
- Salvemini, D., Muscoli, C., Riley, D. P., & Cuzzocrea, S. (2002). Superoxide dismutase mimetics. *Pulm Pharmacol Ther*, 15(5), 439-447. doi: 10.1006/pupt.2002.0374
- Samuni, A., Krishna, C. M., Riesz, P., Finkelstein, E., & Russo, A. (1988). A novel metal-free low molecular weight superoxide dismutase mimic. *J Biol Chem*, 263(34), 17921-17924.
- Sato, R., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Hoffman, S. C., Norkus, E. P., & Comstock, G. W. (2002). Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(5), 451-457.
- Scharf, A., Rockel, T. D., & von Mikecz, A. (2007). Localization of proteasomes and proteasomal proteolysis in the mammalian interphase cell nucleus by systematic application of immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol*, 127(6), 591-601. doi: 10.1007/s00418-006-0266-2
- Schilling, J. D. (2016). Dousing fire with gasoline: interplay between lysosome damage and the NLRP3 inflammasome. Focus on "NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx". *Am J Physiol Cell Physiol*, 311(1), C81-82. doi: 10.1152/ajpcell.00174.2016
- Schotte, P., Declercq, W., Van Huffel, S., Vandenabeele, P., & Beyaert, R. (1999). Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett*, 442(1), 117-121.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(5), 283-296.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J. (2017). Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135, 111-125. doi: 10.1016/j.biochi.2017.02.001
- Shalini, S., Puccini, J., Wilson, C. H., Finnie, J., Dorstyn, L., & Kumar, S. (2015). Caspase-2 protects against oxidative stress in vivo. *Oncogene*, 34(38), 4995-5002. doi: 10.1038/onc.2014.413
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a008714. doi: 10.1101/cshperspect.a008714
- Shen Han-Ming, V. P. (2014). *Necrotic Cell Death* (H.-M. Shen & P. Vandenabeele Eds. 1 ed.): Humana Press.
- Shirley, S., & Micheau, O. (2013). Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Lett*, 332(2), 141-150. doi: 10.1016/j.canlet.2010.10.009
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, 11, 613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 86, 715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 311(1152), 617-631.
- Sosna, J., Philipp, S., Fuchslocher Chico, J., Saggau, C., Fritsch, J., Foll, A., . . . Adam, D. (2016). Differences and Similarities in TRAIL- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Necroptotic Signaling in Cancer Cells. *Mol Cell Biol*, 36(20), 2626-2644. doi: 10.1128/MCB.00941-15
- Soule, B. P., Hyodo, F., Matsumoto, K., Simone, N. L., Cook, J. A., Krishna, M. C., & Mitchell, J. B. (2007). The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med*, 42(11), 1632-1650. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.030

- Spes, A., Sobotic, B., Turk, V., & Turk, B. (2012). Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines. *Biol Chem*, 393(12), 1417-1431.
- Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2006). Do lysosomes induce cell death? *IUBMB Life*, 58(8), 493-494. doi: 10.1080/15216540600719630
- Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*.
- Subramaniam, K., Hirpara, J. L., Tucker-Kellogg, L., Tucker-Kellogg, G., & Pervaiz, S. (2013). FLIP: a flop for execution signals. *Cancer Lett*, 332(2), 151-155. doi: 10.1016/j.canlet.2012.07.005
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., . . . Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213-227. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.031
- Sun, S. C. (2012). The noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunol Rev*, 246(1), 125-140. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x
- Suresh, M. V., Yu, B., Lakshminrusimha, S., Machado-Aranda, D., Talarico, N., Zeng, L., . . . Raghavendran, K. (2013). The protective role of MnTBAP in oxidant-mediated injury and inflammation in a rat model of lung contusion. *Surgery*, 154(5), 980-990. doi: 10.1016/j.surg.2013.05.023
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(9). doi: 10.1101/cshperspect.a008706
- Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(8), 1400-1404.
- Terman, A., & Kurz, T. (2013). Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal*, 18(8), 888-898. doi: 10.1089/ars.2012.4885
- Thiele, D. L., & Lipsky, P. E. (1990). Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. *Proc Natl Acad Sci US A*, 87(1), 83-87.
- Thorburn, A. (2008). Studying autophagy's relationship to cell death. *Autophagy*, 4(3), 391-394.
- Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*, 51(5), 1000-1013. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017
- Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Oresic, K., & Turk, V. (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem*, 383(7-8), 1035-1044. doi: 10.1515/BC.2002.112
- Turk, B., Turk, D., & Turk, V. (2012). Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J*, 31(7), 1630-1643. doi: 10.1038/emboj.2012.42
- Turk, B., & Turk, V. (2009). Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J Biol Chem*, 284(33), 21783-21787.
- Turk, V., Stoka, V., & Turk, D. (2008). Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci*, 13, 5406-5420.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 68-88.
- Turk, V., Turk, B., & Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*, 20(17), 4629-4633.
- Uchimoto, T., Nohara, H., Kamehara, R., Iwamura, M., Watanabe, N., & Kobayashi, Y. (1999). Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. *Apoptosis*, 4(5), 357-362.
- 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 Microbe*, 11(3), 290-297. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.016

- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuca, K., & Musilek, K. (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*, 90(1), 1-37. doi: 10.1007/s00204-015-1579-5
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 135-147.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., . . . Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*, 17(6), 922-930.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(10), 700-714. doi: 10.1038/nrm2970
- Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, 101, 26-32. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035
- Vasiljeva, O., Dolinar, M., Pungercar, J. R., Turk, V., & Turk, B. (2005). Recombinant human cathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Lett*, 579(5), 1285-1290. doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.093
- Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., . . . Reinheckel, T. (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res*, 66(10), 5242-5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4463
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., & Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des*, 13(4), 387-403.
- Vasiljeva, O., & Turk, B. (2008). Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie*, 90(2), 380-386. doi: 10.1016/j.biochi.2007.10.004
- Villamil Giraldo, A. M., Appelqvist, H., Ederth, T., & Ollinger, K. (2014). Lysosomotropic agents: impact on lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Biochem Soc Trans*, 42(5), 1460-1464.
- Vizovisek, M., Vidmar, R., Van Quickelberghe, E., Impens, F., Andjelkovic, U., Sobotic, B., . . . Fonovic, M. (2015). Fast profiling of protease specificity reveals similar substrate specificities for cathepsins K, L and S. *Proteomics*, 15(14), 2479-2490. doi: 10.1002/pmic.201400460
- von Karstedt, S., Montinaro, A., & Walczak, H. (2017). Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*, 17(6), 352-366. doi: 10.1038/nrc.2017.28
- Walczak, H. (2011). TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev*, 244(1), 9-28. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01066.x
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L. F., . . . Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*, 54(1), 133-146. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.003
- Wang, X., Olberding, K. E., White, C., & Li, C. (2011). Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 18(1), 38-47. doi: 10.1038/cdd.2010.68
- Welss, T., Sun, J., Irving, J. A., Blum, R., Smith, A. I., Whisstock, J. C., . . . Abts, H. F. (2003). Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry*, 42(24), 7381-7389. doi: 10.1021/bi027307q
- White, E. (2008). Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy*, 4(4), 399-401.
- Wilcox, C. S. (2010). Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*, 126(2), 119-145. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.003

- Wilson, P. D., Firestone, R. A., & Lenard, J. (1987). The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole. *J Cell Biol*, 104(5), 1223-1229.
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(12), a006734. doi: 10.1101/cshperspect.a006734
- Wu, W., Liu, P., & Li, J. (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*, 82(3), 249-258. doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.08.004
- Xilouri, M., & Stefanis, L. (2016). Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res Rev*, 32, 13-21. doi: 10.1016/j.arr.2016.07.001
- Xu, H., & Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol*, 77, 57-80.
- Xu, J. (2005). Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 28, Unit 28 21. doi: 10.1002/0471142727.mb2801s70
- Yadav, N., & Chandra, D. (2014). Mitochondrial and postmitochondrial survival signaling in cancer. *Mitochondrion*, 16, 18-25. doi: 10.1016/j.mito.2013.11.005
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 1-32. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8_1
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 124-131. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.014
- Young, M. M., Kester, M., & Wang, H. G. (2013). Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J Lipid Res*, 54(1), 5-19.
- Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B., & Lavrik, I. N. (2015). Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role. *Cell Mol Life Sci*, 72(3), 505-517. doi: 10.1007/s00018-014-1757-2
- Zavrsnik, J., Butinar, M., Prebanda, M. T., Krajnc, A., Vidmar, R., Fonovic, M., . . . Vasiljeva, O. (2017). Cystatin C deficiency suppresses tumor growth in a breast cancer model through decreased proliferation of tumor cells. *Oncotarget*, 8(43), 73793-73809. doi: 10.18632/oncotarget.17379
- Zeeuwen, P. L. (2004). Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol*, 83(11-12), 761-773.
- Zhang, J. (2015). Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists--mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol*, 4, 242-259. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.003
- Zhang, L., Wang, K., Lei, Y., Li, Q., Nice, E. C., & Huang, C. (2015). Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic Biol Med*, 89, 452-465. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.030

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

Kavčič, N., Pegan, K., Turk, B. (2016). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifier (Review). *Biol Chem.* (doi: 10.1515/hsz-2016-0252).

Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. (2018). Comparative study of the differential cell death protecting effect of various ROS scavengers. *Biol Chem.* (doi: 10.1515/hsz-2017-0317).

Prispevek na konferenci

Ustne predstavitve:

- Kavčič, N., Sobotič, B., Butinar, M., Turk, B. »Cathepsin C is critical for the release of other cathepsins from lysosomes in leucyl-leucine methyl ester-triggered apoptosis«. 9th IPSSC + 11th Young Researchers' Day CMBE; Ljubljana, Slovenija; 19. – 20. april 2017.
- Kavčič, N., Sobotič, B., Butinar, M., Turk, B. »Cathepsin C is critical for the release of other cathepsins from lysosomes in LLOMe-triggered apoptosis«. 34th Winter School on Proteinases and Inhibitors; Tiers, Italija; 8. – 12. marec 2017.
- Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. »The effect of various antioxidants in cell death-related oxidative stress.« 32nd Winter School on Proteinases and Inhibitors; Tiers, Italija; 25. februar – 1. marec 2015.
- Kavčič, N., Pegan, K., Turk, B. »Nekroptoza – nova oblika celične smrti«. Dan biomolekularnih znanosti; Ljubljana, Slovenija; 25. september 2014.
- Kavčič, N., Pegan, K., Turk, B. »The effect of different antioxidants in menadione- and staurosporine-induced oxidative stress.« 31st Winter School on Proteinases and Inhibitors; Tiers, Italija; 26. februar – 2. marec 2014.

Predstavitve posterjev:

- Kavčič N., Butinar M., Sobotič B., Hfner Česen M., Petelin A., Bojić L., Turk B. »Lysosomal cathepsin C is critical for the release of cathepsins from lysosomes in leucyl-leucine methyl ester-triggered cell death«. FEBS Workshop: 16. International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control; Portorož, Slovenija; 8. – 12. september 2018.
- Kavčič, N., Sobotič, B., Butinar, M., Turk, B. »Cathepsin C is critical for the release of other cathepsins from lysosomes in leucyl-leucine methyl ester-triggered apoptosis«. Mitochondria, apoptosis and cancer – MAC17; Bled, Slovenija; 15. - 18. September 2017.
- Kavčič, N., Sobotič, B., Butinar, M., Turk, B. »Cathepsin C is critical for the release of other cathepsins from lysosomes in leucyl-leucine methyl ester-triggered apoptosis«. 9th IPSSC + 11th Young Researchers' Day CMBE; Ljubljana, Slovenija; 19. – 20. april 2017.
- Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. »Oxidative stress and cell death are affected by exogenous antioxidants«. XVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control; Portorož, Slovenija; 17. – 21. september 2016.
- Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. »The effect of various antioxidants in cell-death related oxidative stress. « FEBS3+: Molecules of Life; Portorož, Slovenija; 16. – 19. september 2015.
- Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. »Differential effect of antioxidants in cell death related oxidative stress in wild-type MEFs. « 40th FEBS congress, The Biochemical Basis of Life; Berlin, Nemčija; 4. – 9. julij 2015.

- Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. »Differential effect of antioxidants in cell death related oxidative stress in wild-type MEFs. « 9th Young Researchers' Day of CMBE (Chemistry, Materials, Biochemistry, Environment); na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana, Ljubljana, Slovenija; 7. april 2015.
- Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. »Differential effect of antioxidants in cell death related oxidative stress in wild-type MEFs. « XIVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control; Portorož, Slovenija; 6. – 10. september 2014.
- Kavčič, N., Pegan, K., Špes, A., Petelin, A., Vandenabeele, P., Turk, V., Turk, B. »ROS as signalling molecules during TNF-alpha induced death molecular pathways. « 8th Young Researchers' Day of CMBE (Chemistry, Materials, Biochemistry, Environment) na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana; Ljubljana, Slovenia; 18. februar 2014.
- Droga Mazovec, G., Kavčič, N., Turk, B. »The ubiquitylation profile of cathepsin L after resveratrol-induced autophagy in HeLa cells. « 8th Young Researchers' Day of CMBE (Chemistry, Materials, Biochemistry, Environment) na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana; Ljubljana, Slovenia; 18. februar 2014.
- Kavčič, N., Pegan, K., Špes, A., Petelin, A., Vandenabeele, P., Turk, V., Turk, B. »ROS as signalling molecules during TNF-alpha induced death molecular pathways. « 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with international participation; Ljubljana, Slovenija; 15. – 18. september 2013.
- Droga Mazovec, G., Kavčič, N., Turk, B. »The interplay between the ubiquitin proteasome system and autophagy in HeLa cells treated with resveratrol or rilmenidine. « 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with international participation; Ljubljana, Slovenija; 15. – 18. september 2013.

Druge objave – prispevki dijakov in študentov

- »ITTC 2016«: Zhengzhou, Beijing, Tianjin, Kitajska; 11. – 20. november 2016; predstavitev dela dijakinj gimnazije Vič - Ane Mengalija in Tiane Karmen Kokalj, Nežka Kavčič kot delovna mentorica: »The effect of resveratrol on the growth and development of cancer cells«.
- »Biomolekularec 2016«: Ljubljana, Slovenija; 22. september 2016; prispevek v zborniku dijakinj gimnazije Vič - Ane Mengalija in Tiane Karmen Kokalj, Nežka Kavčič kot delovna mentorica: »Vpliv resveratrola na rast in razvoj rakavih celic«.
- »Biomolekularec 2016«: Ljubljana, Slovenija; 22. september 2016; prispevek v zborniku magistrske študentke Ane Krišelj, Nežka Kavčič kot delovna mentorica: »Uporaba različnih metod za dokazovanje prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti v živih celicah«.
- »Biomolekularec 2016«: Ljubljana, Slovenija; 22. september 2016; prispevek v zborniku magistrske študentke Nine Štrah, Nežka Kavčič kot delovna mentorica: »Vpliv butilhidroksianizola na signalne poti, sprožene s citokinom TNF- α , na celični liniji človeškega adenokarcinoma debelega črevesa«.

Biografija

Nežka Kavčič je dodiplomski študij zaključila na Biotehniški fakulteti septembra 2010 in s tem pridobila naziv univerzitetna diplomirana mikrobiologinja.

Med oktobrom 2010 in avgustom 2011 je kot pred-doktorska študentka in štipendistka delala na Univerzi v Novi Gorici in na International School for Advanced Studies v Trstu.

Oktobra 2011 se je vpisala na podiplomski študij Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana, smer Nanoznanosti in nanotehnologija (NANO3) pri mentorju prof. ddr. Borisu Turku.

Istočasno je postala tudi štipendistka na Institutu »Jožef Stefan«, na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, kjer je opravljala svoje raziskovalno delo.

Od julija 2017 je zaposlena kot strokovna sodelavka na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo.

Avtorica je opravila tečaj za usposobljenost za delo s poskusnimi živalmi (izvajalec) in se udeležila številnih konferenc ter delavnic.

Priloge

Kavčič, N., Pegan, K., Turk, B. (2016). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifier (Review). Biol Chem. (doi: 10.1515/hsz-2016-0252).

Kavčič, N., Pegan, K., Vandenabeele, P., Turk, B. (2018). Comparative study of the differential cell death protecting effect of various ROS scavengers. Biol Chem. (doi: 10.1515/hsz-2017-0317).

Review

Nežka Kavčič^a, Katarina Pegan^a and Boris Turk^{*}

Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifiers

DOI 10.1515/hsz-2016-0252

Received July 16, 2016; accepted September 5, 2016; previously published online September 13, 2016

Abstract: Lysosome is the central organelle for intracellular degradation of biological macromolecules and organelles. The material destined for degradation enters the lysosomes primarily via endocytosis, autophagy and phagocytosis, and is degraded through the concerted action of more than 50 lysosomal hydrolases. However, lysosomes are also linked with numerous other processes, including cell death, inflammasome activation and immune response, as well as with lysosomal secretion and cholesterol recycling. Among them programmed cell death pathways including apoptosis have received major attention. In most of these pathways, cell death was accompanied by lysosomal membrane permeabilization and release of lysosomal constituents with an involvement of lysosomal hydrolases, including the cathepsins. However, it is less clear, whether lysosomal membrane permeabilization is really critical for the initiation of cell death programme(s). Therefore, the role of lysosomal membrane permeabilization in various programmed cell death pathways is reviewed, as well as the mechanisms leading to it.

Keywords: apoptosis; cathepsin; lysosome; programmed cell death; programmed necrosis.

Introduction: lysosomes and lysosomal biology

Since the discovery of lysosome (Appelmans et al., 1955; de Duve, 1983), major efforts have been done to understand its biology and multitude functions. Lysosomes are ubiquitous sphere or tubular shape organelles. Their size, abundance and distribution are dependent on the digestive activity and cell type (Xu and Ren, 2015). Lysosomal membrane, which was long thought to serve primarily as the physical barrier to prevent mixing of the highly acidic lumen with cytosol, is known to have a number of other important functions, which are largely associated with the numerous membrane proteins transporters, receptors and enzymes, anchored into the lysosomal membrane. Lysosomal integral membrane proteins (LIMPs) and lysosomal associated membrane proteins (LAMPs) are protected against the attack of proteases by heavy glycosylation, which forms glycocalyx. Membrane is additionally stabilized by heat shock protein 70 kDa (Hsp70) and cholesterol (Saftig et al., 2010; Repnik et al., 2012; Galluzzi et al., 2014; Mroczek and Ryan, 2015).

Lysosomes are the terminal point of intracellular transport, particularly endocytosis, phagocytosis and autophagy. During endocytosis the substrates are first enclosed into the early endosomes, which mature into the late endosomes that finally fuse with lysosomes, resulting in digestion of the engulfed material. However, endocytosis is not only related to degradation by lysosomes, but it is also implicated into recycling of surface receptors and cellular signalling (Sigismund et al., 2012; Settembre et al., 2013; Xu and Ren, 2015). During autophagy, the engulfed contents are transported from the cytoplasm to the lysosomes for final degradation (Ciechanover, 2012; Kaur and Debnath, 2015). According to the physiological activity and the type of cargo distribution to the lysosomes three distinct autophagy pathways are known: macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA). Macroautophagy, an evolutionary conserved process, is present at a low level (constitutive autophagy) in all cells to preserve intracellular balance

^aNežka Kavčič and Katarina Pegan: These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author: Boris Turk**, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, J. Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; Center of Excellence CIPKEBIP, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; and Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Vecna pot 113, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail: boris.turk@ijs.si

Nežka Kavčič: Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, J. Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; and International Postgraduate School Jozef Stefan, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Katarina Pegan: Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, J. Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

and is stimulated during stress conditions, like starvation, imbalance in AMP/ATP ratio, reactive oxygen species stress, endoplasmic reticulum stress and accumulated misfolded proteins. CMA is activated as protection system to avoid proteotoxicity. All CMA substrates contain in the sequence a specific pentapeptide motif (e.g. KFERQ) that serves for binding to the chaperone proteins shock cognate protein 70 (Hsc70), and is delivered to lysosomes via LAMP-2A protein that serves as a receptor (Mizushima et al., 2008; Arias and Cuervo, 2011; Cuervo and Wong, 2014). Microautophagy is the least investigated mechanism, during which the lysosomal membrane is invaginated thereby trapping its content. This pathway was shown to be involved in the clearance of large structures, like mitochondria and peroxisomes. The engulfed membrane is degraded to release the cytoplasmic cargo (Li et al., 2012).

When the cargo finally reaches the lysosome, the delivered content is modified by acidic pH and reducing environment resulting in reduction of the disulfide bonds, disruption of the hydrogen bonds and the connexions between the side chains leading to unfolding of the proteins (Luzio et al., 2000; Turk and Turk, 2009; Cesen et al., 2012). The acidic pH is maintained by V-ATPase and ion homeostasis that are essential for lysosomal maturation and trafficking, proper membrane fission and establishment of the lysosomal membrane potential (Xu and Ren, 2015).

The improper function of autophagy and decreased lysosomal degradation may result in accumulation of lipofuscin (age pigment), an auto-fluorescent material, in lysosomes of post-mitotic long-lived cells (Terman and Brunk, 2004; Hohn and Grune, 2013). Lipofuscin is composed of peroxidized proteins and lipid residues, which may act as endogenous membranolytic compounds. Additionally, some studies have revealed that some metals like aluminum, zinc, copper and iron are trapped within lipofuscin. Among them iron has a special role as it is predominantly responsible for oxidation linked with the Fenton-type reactions, indicating that lysosomes are also involved in iron homeostasis (Kurz et al., 2007; Kurz et al., 2011; Hohn and Grune, 2013; Karlsson et al., 2013; Repnik et al., 2014; Bogdan et al., 2016). However, lysosomes are not associated only with the catabolic functions, but also with other processes, including cell death, inflammasome activation and immune response, as well as with lysosomal secretion and cholesterol recycling (Appelqvist et al., 2013; Merschtik and Ryan, 2015). As a consequence, disturbances in lysosomal functions are associated with numerous human diseases, such as cancer, neurodegenerative disorders, lysosomal storage diseases, cardiovascular

disorders and many inflammation-associated diseases (Eskelinen and Saftig, 2009; Kurz et al., 2011; Appelqvist et al., 2013; Settembre et al., 2013; Jiang and Mizushima, 2014; Hu et al., 2015; Parenti et al., 2015; Bogdan et al., 2016; Stoka et al., 2016).

Lysosomal hydrolases: crucial role of proteases

Crucial role in cargo degradation play lysosomal hydrolases. A number of them has been identified in the lysosomal lumen, including proteases, nucleases, lipases, phosphatases, sulfatases and glycosidases (Hafner Česen et al., 2016). Their function is to hydrolyse the incoming cargo into simple building blocks, which are reused after diffusion or active transport by catabolite exporters into the cytosol (Merschtik and Ryan, 2015; Xu and Ren, 2015).

Among the hydrolases the best characterized are the proteases, in particular the cathepsins. The majority of them is cysteine cathepsins with 11 of them being encoded in the human genome (B, C, F, H, L, K, O, S, V, W, and X). While cathepsins B, C, F, H, L, O, V and X are ubiquitous and are associated with general lysosomal protein degradation, cathepsins K (osteoclasts), W (lymphocytes and natural killer cells) and S (antigen-presenting cells) are tissue-specific with more specialized functions. Cathepsins D and E are aspartic proteases, ubiquitous in late endosomes, while serine protease G is not classified as a true lysosomal protease, because it is present only in azurophil granules, which belong to the group of lysosome-related organelle (LRO), and is normally active at neutral pH. The most abundant are cathepsins B, L and D, and their inhibition was found to substantially reduce autophagy. Acidic pH found in lysosomes does not only help in unfolding the protein substrates, but is also optimal for the activity of cysteine and aspartic cathepsins. Although active, the former are, with exception of cathepsin S, unstable at neutral pH, while the latter are largely inactive due to reversible deprotonation of the active site Asp residues. Besides pH, a number of other cellular mechanisms are known to prevent uncontrolled proteolytic degradation, including by physical separation of the proteases by being contained within lysosomes, requirement for activation of inactive zymogens and the presence of endogenous inhibitors. However, when regulation fails, cathepsins have been found to be involved in numerous pathologies, especially those associated with inflammation, such as arthritis, atherosclerosis, inflammatory bowel diseases and various autoimmune diseases, as well as several types of cancer. In a number of these

conditions, cathepsins were found to be upregulated and often also secreted (Turk et al., 2001; Vasiljeva et al., 2007; Kaminsky and Zhivotovsky, 2012; Turk et al., 2012). In addition, there is increasing evidence that cathepsins when released into the cytosol following lysosomal membrane permeabilization, also contribute to various cell death pathways, thereby playing a dual role (Vasiljeva and Turk, 2008).

In this review, we will focus on the lysosomal membrane permeabilization and its triggers. In addition, involvement of lysosomes and lysosomal proteases in various types of regulated cell death pathways will be discussed.

Lysosomal membrane permeabilization and lysosomotropic reagents

A major step in all cell death pathways associated with lysosomes is the lysosomal membrane permeabilization (LMP) that is characterized by decreased cytosolic and increased lysosomal pH, perturbed iron homeostasis, defects in lysosomal cytoprotective factors and release of hydrolases into the cytosol (Figure 1). However, LMP is not always accompanied by ultrastructural changes of lysosomes (Hafner Česen et al., 2012; Aits and Jaattela, 2013;

Galluzzi et al., 2014). LMP is dependent on the type of the lysosomotropic agent, presence and activity of the lysosomal enzymes, composition of the lysosomal membrane (e.g. cholesterol and sphingolipid ratio) and the level of endocytosis. In addition, it was suggested that not all cells are equally prone to LMP due to the presence of different enzymes at different levels and that this may also differ depending on the LMP-trigger. So far, an essential role of LMP was demonstrated only in the execution of lysosomal cell death (LCD). LMP was often found to accompany other types of cell death as a downstream signal amplifier, but not as a starting event (Galluzzi et al., 2014; Repnik et al., 2014; Gomez-Sintes et al., 2016; Serrano-Puebla and Boya, 2016). Anyhow, in oxidative stress-triggered necrosis, LMP was found to be an early event (Vanden Berghe et al., 2010). In addition, lysosomal malfunction as a consequence of LMP is also contributing to autophagy defects (Galluzzi et al., 2014; Serrano-Puebla and Boya, 2016). Interestingly, cells were able to recover from moderate LMP through a selective form of autophagy termed lysophagy, in which damaged lysosomes are recovered (Hung et al., 2013; Maejima et al., 2013).

Collectively, it is now clear that LMP is tightly associated with cell death, but the molecular mechanisms downstream of LMP differ and depend on the LMP trigger and cell type (Turk and Turk, 2009; Repnik et al., 2012; Aits and Jaattela, 2013; Ashoor et al., 2013).

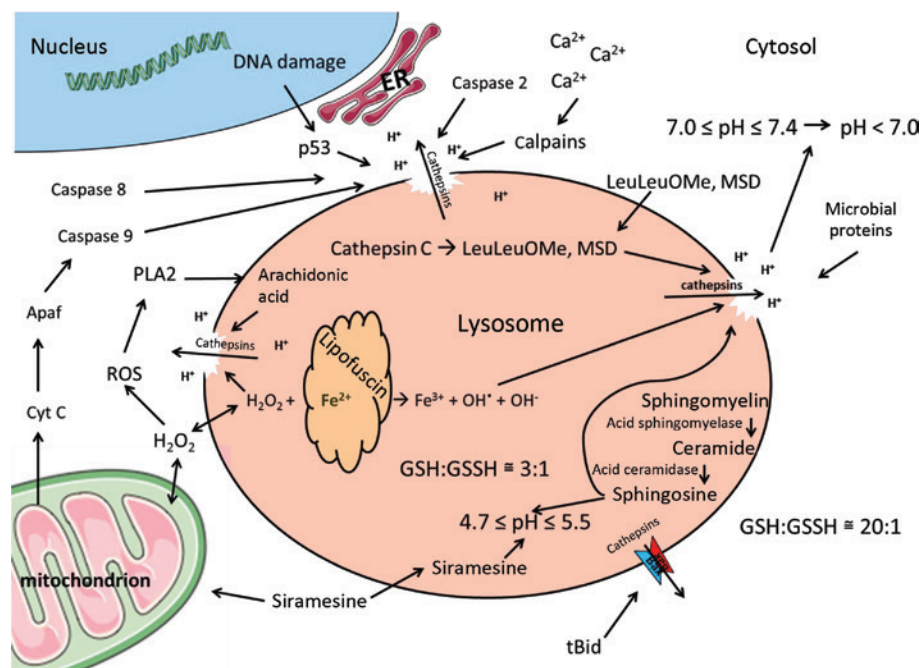


Figure 1: Lysosome and LMP.

Lysosomal changes and mechanisms leading to organelle impairment and LMP are shown together with different LMP triggers. GSH, glutathione; GSSH, glutathione disulfide; ER, endoplasmic reticulum; Apaf, apoptotic protease activating factor 1; LCD, lysosomal cell death.

Lysosomotropic agents

Disruption of lysosomal morphology and activity can be a consequence of osmotic or direct membrane lysis (Repnik et al., 2014; Villamil Giraldo et al., 2014). In the case of osmotic lysis, a relatively high quantity of soluble compounds is trapped in the lumen, thereby increasing the osmotic pressure. On the other hand, increased osmotic pressure can be also triggered by the reagents that affect membrane permeability, resulting in the influx of water. Other destabilising factors are compounds with surfactant properties. After the critical micelle concentration is reached, these reagents evolve detergent-like activity (Gomez-Sintes et al., 2016).

To induce membranolytic activity, high concentrations of exogenous lysosomotropic detergents must be used to destabilize intracellular membranes and not only the plasmalemma. Among these compounds the most important are the lysosomotropic compounds (Figure 1). Lysosomotropic compounds are usually weak basis that upon entering lysosomes become protonated at acidic pH, thereby remaining trapped within lysosomes. However, they often affect lysosomal pH only, but do not trigger LMP. Such examples are chloroquine and ammonium chloride, which exert the so-called “sponge effect” by accumulating in the lysosomes due to protonation at acidic pH thereby increasing the vesicles volume and pH. The latter is, however, seen as a decrease in the signal of lysosomotropic dyes such as acridine orange and various lysotrackers and therefore sometimes misinterpreted as LMP, requiring caution in data interpretation (Repnik et al., 2014). Another such example is siramisine, a σ_2 -receptor agonist, which was initially reported to trigger LMP and subsequent cell death in several cancer cells (Ostenfeld et al., 2005; Ostenfeld et al., 2008), but was recently found to induce cell death associated with mitochondrial destabilization and disrupted metabolic homeostasis in the absence of LMP (Hafner Česen et al., 2013).

On the other hand, lysosomotropic detergents destabilize membrane lipids after delivery into the lysosome. Early examples of lysosomotropic detergents were amines with hydrophobic side-chains, such as imidazole or morpholine (Miller et al., 1983), although it is not completely clear whether they disrupt lysosomal membranes only or also plasmalemma, and whether this is cell type-dependent. However, the best characterized lysosomotropic detergent is L-leucyl-L-leucine methyl ester (LeuLeuOMe), which can kill a large variety of cells with bone marrow-derived immune cells being the most sensitive (Thiele and Lipsky, 1990; Uchimoto et al., 1999; Droga-Mazovec et al., 2008). This dipeptide ester was shown to accumulate

inside lysosomes and acquired detergent properties after polymerization mediated by cathepsin C (Thiele and Lipsky, 1990). Moreover, the compound showed excellent results in the prevention of graft-versus-host disease in mice and entered clinical studies for allogeneic bone marrow transplantation (Filicko-O'Hara et al., 2009), which were, however, discontinued. Among the others, O-methyl-serine-dodecylamide-hydrochloride (MSDH) and sphingosine have gained more attention. MSDH was thus shown to trigger early LMP accompanied by leakage of lysosomal proteases, changed iron homeostasis and oxidative stress, followed by release of cytochrome C from mitochondria and activation of caspases at low to moderate concentrations in a mouse macrophage cell line. However, high doses of MSDH resulted in necrosis of the target cells (Li et al., 2000; Ghosh et al., 2011). Sphingosine, on the other hand, is one of the endogenous lysosomotropic agents, which causes changes in lysosomal membrane lipid composition. Sphingosine is generated by concerted action of acid sphingomyelinase and acid ceramide. While the former converts sphingomyelin into ceramide, the latter converts ceramide into sphingosine. Another important factor in the sphingosine detergent activity seems to be also cathepsin B, which degrades sphingosine into the anti-apoptotic sphingosine 1-phosphate. In addition, sphingosine membranolytic properties depend on pH and lipid composition (Johansson et al., 2010; Young et al., 2013; Villamil Giraldo et al., 2014). In addition, destabilization of lysosomal membrane can be mediated also by non-permeable compounds that accumulate in lysosomes after delivery by endocytosis (Aits and Jaattela, 2013; Repnik et al., 2014; Villamil Giraldo et al., 2014).

ROS as LMP trigger

A potent intracellular LMP inducer, following exposure to various drugs, heavy metals, ionising radiation, photodynamic therapy and different injuries, is also oxidative stress (Figure 1A) (Česen et al., 2012; Aits and Jaattela, 2013). In the lysosome, low mass-iron is released after degradation of ferruginous compounds. During increased oxidative stress H_2O_2 enters into the lysosomes and reacts with redox-active iron in Fenton-type reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$). Alternatively, $O_2^{\cdot-}$ presence leads to reduction of iron and occurrence of harmful hydroxyl radical $OH^\cdot$. Further, the ferric cation Fe^{3+} formed in the Fenton reaction can react with the superoxide anion in the so-called Haber-Weiss reaction, generating ferrous iron again ($Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$), which can re-enter into the

Fenton reaction (Kurz et al., 2007; Kurz et al., 2011; Dixon et al., 2012). Depending on the extent of highly reactive HO[•] and OH[•] production, LMP is triggered by lipid peroxidation and destabilization of lysosomal membrane proteins. It was suggested that ROS initiate also activation of phospholipase A2 (PLA2) and lysosomal Ca²⁺ channels. PLA2 may affect trafficking of K⁺ and H⁺ ions and lysosomal membrane integrity by the production of arachidonic acid, which exhibits detergent-like properties (Kurz et al., 2011; Cesen et al., 2012; Aits and Jaattela, 2013).

However, not all lysosomes are equally sensitive to oxidative stress due to variation in the degradation level of the iron-binding molecules. Consistent with this theory, the level of lysosomal redox-active iron in healthy cells should be strictly regulated by transporting iron from lysosomes to cytosol and keeping it in a non-redox-active form. Hsp70 and ferritin can bind iron in order to diminish LMP. Therefore, many efforts were invested in the introduction of redox-active iron in malignant cells to be more responsive to irradiation-induced ROS production. In addition, anti-cancer photodynamic therapy is based on the intra-lysosomal accumulation of photosensitizers that cause increased oxidative stress resulting in LMP, release of lysosomal hydrolases and mitochondrial membrane permeabilization (MMP) (Kurz et al., 2007, 2011; Ghosh et al., 2011; Marino et al., 2013).

In the cell, excessive ROS act as general destabilizing factors, but cellular antioxidants can minimize their impact. Lysosomal integrity can be maintained by vitamins C and E, coenzyme Q10, glutathione, catalase, superoxide dismutase, etc. However, their anti-oxidative properties can be diminished by the low lysosomal pH (Johansson et al., 2010; Kurz et al., 2011; Aits and Jaattela, 2013; Marino et al., 2013; Bogdan et al., 2016).

LMP-triggering proteins

An interesting group of biomolecules that can trigger LMP are bacterial, fungal and snake toxins, and viral proteins. Perhaps the best known example is the diphtheria toxin, which forms pores in endolysosomal membranes after pH modification. Also several other toxins, such as tetanus, botulinum an anthrax toxin, nigericin, leukotoxin, mycotoxins, venom toxins from cobra and rattlesnake, have been associated with LMP. On the other hand, viral proteins can initiate LMP by generating lysosomal membrane rupture, pore formation, membrane curvature stress or vesicular swelling or even by detergent-like activity (Tosteson and Chow, 1997; Fuchs and Blaas, 2010; Johansson et al., 2010; Maier et al., 2010; Aits and Jaattela, 2013;

Jiang and Mizushima, 2014; Ju et al., 2015). In addition, proapoptotic Bcl2 family members Bax and Bak that are primarily involved in mitochondrial membrane permeabilization, and Bid, were also suggested to be involved in triggering LMP (Johansson et al., 2010).

Lysosomes in cell death

Following LMP, lysosomes start leaking their contents into the cytosol, which may lead to cell death. Unlike the pathways leading to LMP, pathways downstream from LMP are clearer and are critically dependent on the release of lysosomal hydrolases into the cytosol. Although their activity in the cytosol is lower than in the endolysosomal vesicles, it can still result in substantial damage, depending on the extent of LMP and cytosolic (protease) inhibitors, which can protect cells against low level LMP, thereby serving an emergency role (Turk, 2006), such as demonstrated for stefin B. Its genetic ablation was namely shown to dramatically sensitize primary mouse mammary cancer cells to LeuLeuOMe (Butinar et al., 2014). Extensive LMP leads to uncontrolled necrosis, which will not be discussed further, while moderate LMP contributes to apoptosis and various types of regulated necrosis, including necroptosis, ferroptosis, oxytosis, pyrogenic cell death, cornification and parthanatos (Figure 2) (Turk and Turk, 2009; Cesen et al., 2012; Lima et al., 2013; Galluzzi et al., 2014; Vanden Berghe et al., 2014). Like in apoptosis also in regulated necrosis LMP can be an initiator, an amplifier or only a bystander of the process. Moreover, lysosomes do not contribute to regulated necrosis only by the activity of released cathepsins but also by their elevated oxidative potential and iron load (Figure 3) (Vanden Berghe et al., 2010; Galluzzi et al., 2014). A comparison between different types of cell death is presented in Table 1.

Apoptosis

Depending on the initial signal, apoptosis can be driven by mitochondria (intrinsic pathway) or by ligation of death ligands to transmembrane receptors from the TNF family (extrinsic pathway), which both converge at the level of caspase 3 activation. The two pathways are connected via the BH3-only proapoptotic Bcl-2 family member Bid, which is a substrate of caspase 8. Such truncated form of Bid, tBid, then engages the mitochondrial pathway in the so-called type I cells, thereby amplifying the signal. LMP somehow does not fit into the main story. The early idea that cathepsins released from the lysosomes would

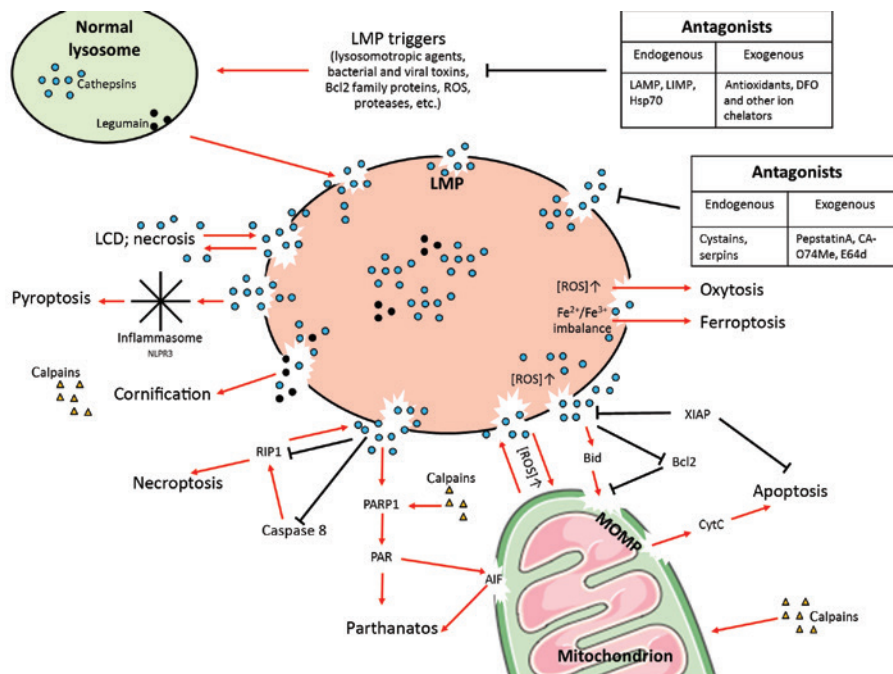


Figure 2: LMP levels define cell death outcome.

At low or moderate LMP, apoptotic cell death or regulated necrosis may occur, although cells can also rescue through engagement of lysophagy. When levels are too high, there is increased possibility for necrosis.

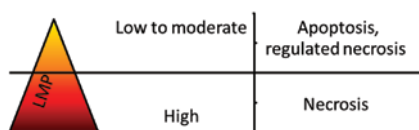


Figure 3: Schematic presentation of lysosomal involvement in programmed cell death signalling pathways and its regulation.

activate procaspases, as shown *in vitro* for cathepsin G (Zhou and Salvesen, 1997), does not work (Stoka et al., 2001). The only exception is cathepsin D, which was shown to be able to activate procaspase 8 in neutrophils (Conus et al., 2008). However, this is more an exception than a rule, as cathepsin D is extremely abundant in neutrophils. Moreover, there is no endogenous inhibitor of cathepsin D in mammals, suggesting lower level of control.

The first identified substrate of cathepsins, including cathepsin D, leading to apoptosis is Bid. Similarly to caspase 8 and granzyme B, all the cathepsins cleave Bid in the same unstructured region, called the bait loop (Stoka et al., 2001; Cirman et al., 2004; Heinrich et al., 2004; Blomgran et al., 2007; Droga-Mazovec et al., 2008). However, Bid is not a critical apoptotic substrate of cathepsins as demonstrated in neuronal apoptosis in mice deficient in the major cytosolic inhibitor of cysteine cathepsins. Simultaneous ablation of stefin B and Bid had namely no effect on the progression of cerebellar apoptosis (Houseweart

et al., 2003). Later, several additional apoptotic substrates of cathepsins were identified, including the anti-apoptotic Bcl2 family proteins Bcl-2, Bcl-extra-large (Bcl-XL) and induced myeloid leukaemia cell differentiation protein-1 (Mcl-1). This all points out to engagement of mitochondrial pathway. Moreover, cathepsins can also cleave XIAP following its release from mitochondria, thereby ensuring the propagation of apoptosis (Droga-Mazovec et al., 2008). The importance of cathepsins for triggering LMP-mediated cell death was demonstrated also in primary tumor cells, which were genetically ablated for cathepsin B or the major cytosolic cathepsin inhibitor stefin B (Vasiljeva et al., 2008; Butinar et al., 2014). While triggering LMP by lysosomotropic detergents seems an attractive alternative to kill cancer or immune cells overexpressing anti-apoptotic Bcl2 proteins in cancer therapy, LMP does not seem to be a major apoptotic pathway. However, since mitochondrial membrane permeabilization (MMP) results also in oxidative stress, which may trigger LMP, it can be suggested that secondary LMP may amplify apoptosis. Of course, this is probably true also for other LMP stimuli. There were some controversies concerning the role of LMP in the extrinsic pathway, suggesting that cathepsins, in particular cathepsin B, may act as important direct executioners of apoptosis (Guicciardi et al., 2004; Kirkegaard and Jaatela, 2009). However, later studies revealed that cathepsins are not the main players (Bojic et al., 2007; Wattiaux et al.,

Table 1: Characteristics of different types of programmed cell death.

Cell death type	Characteristics		Morphological characteristics	Activation of caspases	Occurrence/role of LMP	Iron dependence
	Induction					
Apoptosis	Extrinsic or intrinsic		Blebbing, condensation of chromatin and cytoplasm, mitochondria depolarization, formation of apoptotic bodies	Yes – apoptotic caspases	Usually late stage to amplify the signal; exception lysosomal apoptosis	No
Necroptosis	TNF and other inducers, no caspase activity		Oncosis, dismantling	No	Late event	No
Ferroptosis and oxytosis	Erastin inhibition, depletion of cysteine/glutathione			No	Supporting, late event	Yes
Pyrogenic cell death	Microbial infection in immune cells			Yes – inflammatory caspases	Extent and timing of LMP induce different cell death subtypes	No
Parthanathos	Excessive activation of PARP1; PAR polymer formation			Not obligatory	Not clear yet – PARP1 degraded after LMP	No
Cornification	Simultaneous induction, possible role of EDAR, XEDAR and TROY receptors		Organelle degradation, formation of cornified envelope	Apoptotic caspases probably not involved, important role of caspase 14	Possibly important,	No

2007; Vasiljeva et al., 2008; Oberle et al., 2010; Spes et al., 2012). In addition, LMP was often linked to neuronal cell death, where pathways may be somewhat different than in other cells described above. As the role of lysosomes and LMP in apoptosis was a subject of many reviews, it will not be discussed her in more details (Turk and Turk, 2009; Hafner Česen et al., 2012; Aits and Jaattela, 2013; Repnik et al., 2014; Stoka et al., 2016; Yu et al., 2016).

Necroptosis

The most studied form of regulated necrosis is necroptosis, which relies on the activation of receptor interacting protein kinases (RIPK) 1 and 3. Many inducers of necroptosis have been identified so far, however, the tumor necrosis factor (TNF)-induced pathway in the absence of active caspase 8, which otherwise cleaves the two kinases and drives cells into apoptosis, is the most studied one (Pasparakis and Vandenabeele, 2015). In contrast to accidental necrosis where LMP is an early event, in TNF-induced necroptosis LMP occurs at a later stage (Vanden Berghe et al., 2010). In a recent study, cysteine cathepsins B and S, and to a minor extent also cathepsin L, have been demonstrated to cleave RIPK1 in macrophages and only the combined inhibition of caspases and cathepsins has augmented TNF-necroptosis (McComb et al., 2014). In another study, dendritic cells treated with the RIG-I-like receptor adjuvant polyinosinic-polycytidlic acid (poly IC) also showed disrupted lysosomal integrity and cathepsins release. Interestingly, in the majority of the cell population, released cathepsin D acted pro-inflammatory by cleaving caspase-8 which resulted in enhanced nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)-mediated production of cytokines. However, in a minor portion of the cell population cathepsin D cleavage of caspase-8 resulted in RIPK1-dependent cell death. As only the inhibition of all cathepsins, and not only cathepsin D or cysteine cathepsins, reduced necroptosis, the authors speculated that other lysosomal cathepsins besides cathepsin D may be involved in facilitating poly IC-stimulated necroptosis (Zou et al., 2013).

Based on the available data, it is difficult to conclude if cathepsins promote or delay necroptosis. Most probably, the function of LMP and cathepsins depends on the type of cells and their local microenvironment. It is known that depending on the molecular momentum pro-apoptotic factors can antagonize necroptosis (Ofengeim and Yuan, 2013; Hernandez et al., 2015). In other forms of regulated necrosis described below, LMP

and cathepsins seem to contribute to cell death rather than to limit it.

Ferroptosis and oxytosis

Ferroptosis occurs due to erastin inhibition of the XC-cysteine/glutamine antiporter causing cysteine and consequently glutathione depletion. This allows an increase in Fenton generated ROS and subsequently major lipid damage. The critical factor in ferroptosis is most likely antioxidant insufficiency (Dixon et al., 2012; Dixon and Stockwell, 2014). As described above, lysosomes are important cellular pools of redox-active iron and their biochemistry creates an excellent environment for Fenton reactions (Kurz et al., 2011). Interestingly, not all triggers that initiate Fenton reactions in lysosomes cause ferroptosis (Dixon et al., 2012). This further suggests that iron-catalyzed ROS from lysosomes are dispensable drivers of ferroptosis (Dixon and Stockwell, 2014). In addition, it was shown that ferroptosis was not affected by the broad spectrum cysteine cathepsin inhibitor E64d implying that lysosomal cysteine cathepsins are neither critical for ferroptotic cell death (Dixon et al., 2012). It can be therefore suggested that lysosomes have a supportive rather than an essential role in ferroptosis.

Oxytosis was initially described as oxidative glutamate-induced death of neuronal cells (Tan et al., 2001; Dixon and Stockwell, 2014). Similar to ferroptosis, oxytosis also relies on the prevention of cysteine uptake by the XC-cysteine/glutamine antiporter. However, in oxytosis this is achieved by cysteine depletion or glutamate saturation. Furthermore, like in ferroptosis also in oxytosis ROS damage membrane lipids. However, this is not sufficient for killing the cell and additional stimuli, such as calcium influx from the extracellular space, which results in activation of calpains, are required (Henke et al., 2013). As calpains have been previously suggested to be involved in triggering LMP (Yamashima, 2004), this could provide a link between LMP and oxytosis. However, glutamate treatment of mouse hippocampal HT22 cells triggered lysosomal ROS production and cell death but not LMP (Kubota et al., 2010), suggesting a supporting rather than an essential role of lysosomes in oxytosis.

Pyroptosis

Pyroptosis was discovered as a special form of lytic cell death, induced by microbial infection that is accompanied

by the release of proinflammatory cytokines interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 18 (IL-18). Together with necroptosis it has been recently classified as a form of programmed necrosis, where a major role is played by the proinflammatory caspases 1 and 11 in mouse, while in humans the latter is replaced by caspases 4 and 5 (Cookson and Brennan, 2001; Averette et al., 2009; Lamkanfi and Dixit, 2014; Wallach et al., 2016). The process is started by the activation of intracellular nucleotide oligomerisation domain-like recognition receptors (NLRs) that form the inflammasome together with the apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), which enable pro-caspase 1 activation. In such way, the inflammasome promotes maturation of the pyrogenic IL-1 β and IL-18 cytokines that are secreted from cells. A major role in the process also plays the caspase 11 substrate gasdermin D (GSDMD), which was found to be critical for non-canonical inflammasome signalling by Gram-negative bacteria and subsequent pyroptosis, as well as for activation of IL-1 β (Guo et al., 2015; Kayagaki et al., 2015). In addition, recent findings have provided evidence that the N-terminal domains of GSDMD and other gasdermin proteins (GSDMA and GSDMA3) are involved in pyroptotic pore formation. These pore-forming proteins can affect either plasmalemma or peroxisome and mitochondrial membranes (Ding et al., 2016; Sborgi et al., 2016).

There is also increasing evidence that inflammasome activation triggered by different stimuli, including bacterial toxins, silica crystals, aluminum salts, lipofuscin and lysosomotropic detergent LeuLeuOMe (Hornung et al., 2008; Duewell et al., 2010; Tseng et al., 2013), cholesterol crystals (Duewell et al., 2010), and mitochondrial ROS (Heid et al., 2013) is accompanied by LMP. For example, *Bacillus anthracis* lethal toxin (LT) triggers NLRs and also induces LMP in macrophages, which results in pyroptotic cell death. Moreover, active cathepsins were found in the cytosol of LT-treated macrophages and their inhibition prevented LT-induced pyroptosis, suggesting that a moderate LMP could contribute to inflammasome activation (Averette et al., 2009). In addition, it has been demonstrated that the cathepsin B-selective inhibitor CA-074-Me, but not cathepsin B deficiency, effectively blocked pyroptosis and IL-1 β release mediated by silica (Hornung et al., 2008; Tseng et al., 2013). However, it still unclear if cathepsins induce inflammasome activation directly or indirectly through a yet unidentified signalling pathway (Hornung et al., 2008; Averette et al., 2009; Newman et al., 2009; Lima et al., 2013).

Surprisingly, in the study of Lima et al. (Lima et al., 2013) early lysosomal rupture by LeuLeuOMe and alum

in macrophages resulted in necrotic cell death independent of the inflammasome-activated caspase-1. The authors observed that LMP resulted in a range of opposing cellular responses, from a broad degradation of cellular proteins, including caspase-1, IL-1 β , and IL-18, to a minor activation of pro-caspase-1 and pro-IL-1 β . Importantly, activation of caspase-1 did not depend on the inflammasome activation. The authors named this pyrogenic cell death lysosome-mediated necrosis. They further observed that the release of IL-1 β was still dependent on caspase-1 processing, whereas the final cell death was not (Lima et al., 2013). Similar to pyroptosis, also LeuLeuOMe-mediated necrosis and IL-1 β maturation could be attenuated by CA-074-Me, but not by genetic ablation of cathepsin B, in agreement with the lower specificity of the methylated form of the inhibitor. LeuLeuOMe-triggered cell death in monocytes, dendritic cells and neutrophils, but not pyroptosis, could be also prevented by ablation of cathepsin C. Furthermore, downregulation of the aspartic cathepsin D in macrophages also blocked LeuLeuOMe necrosis, suggesting a link between cathepsin D and cathepsin C activation in lysosome-mediated necrosis (Lima et al., 2013; Brojatsch et al., 2015). However, at least *in vitro* studies do not support the role of cathepsin D in cathepsin C activation (Dahl et al., 2001).

Another caspase-1-independent form of cell death named pyronecrosis has been described in response to *Shigella flexneri* and *Neisseria gonorrhoeae* infection. Also in these cases, inhibition of cathepsin B, and possibly other proteases, by CA-074-Me attenuated cell death and limited inflammatory cytokine release (Willingham et al., 2007; Duncan et al., 2009). This further suggests that inducers of pyrogenic cell death, including lysosome-destabilizing agents, trigger different cellular events, which importantly rely on the extent and timing of LMP.

Cornification

Cornification is a distinct type of programmed cell death of epidermal cells, closely related to skin layers' formation. Corneocytes – dead keratinocytes – become part of the outer skin barrier, fundamental for protection against mechanical, chemical or biological stressors. During this 2-weeks' long cellular transformation, various enzymes become involved in organelle degradation, such as proteases, nucleases, and transglutaminases (Lippens et al., 2009; Eckhart et al., 2013). After degradation, free areas within the cell are replaced by cytoskeleton and a cornified cell envelope is created at the intracellular edges of the cell. In spite of many studies about cornification,

the exact role of lysosomal proteases and LMP remains unclear, although cathepsins V and L and legumain have been detected in the cytosol of keratinocytes. One of the crucial regulators of cornification seems to be the cysteine protease inhibitor cystatin M/E, which inhibits legumain and cathepsins V and L (Zeeuwen et al., 2009). Its genetic ablation resulted in mice dying shortly after birth due to disturbed cornification, impaired barrier function and consequent dehydration (Zeeuwen et al., 2002). The critical cystatin E/M target seems to be cathepsin L/V, as simultaneous ablation of cathepsin L rescued cystatin E/M deficient mice lethality (Zeeuwen et al., 2010). Based on the deletion of cystatin E/M in a reconstructed human skin model, which showed an impaired epidermis development instead of ichthyosis-like features, it was suggested that the inhibitor might be critical also for humans (Jansen et al., 2012). Moreover, the transglutaminase activity is also dependent on release of cathepsins from lysosomes and Ca²⁺ from endoplasmic reticulum and thereby on cystatin E/M cathepsin L/V axis. However, calpain-1-dependent LMP, which is triggered after tight envelope formation to prevent uncontrolled degradation, occurs from unknown reason (Zeeuwen et al., 2009; Eckhart et al., 2013; Costanzo et al., 2015). Anyhow, dysregulation of proteases and their inhibitors in the skin might be related to development of various diseases, such as Netherton syndrome, Papillon-Lefevre syndrome as well as impaired skin barrier function (Zeeuwen, 2004; Cheng et al., 2009; Zeeuwen et al., 2009; Jansen et al., 2012).

Parthanatos

Poly (ADP-ribose)-polymerase 1 (PARP1), also known as NAD⁺ ADP-ribosyltransferase, is mostly recognized for being engaged in DNA repair. However, hyperactivation of PARP1 leads to regulated necrotic cell death termed parthanatos. PARP1 is a target of many enzymes, among them apoptotic caspases, granzymes and cathepsins. The production of variety of different PARP1 fragments could mediate specific forms of cell death. For example, after LMP cathepsins B, D and G can cleave PARP1 into 44 kDa, 55 kDa, 62 kDa, 74 kDa and 89 kDa necrotic fragments, which might contribute to cell death, although the molecular mechanisms behind this are not completely clear yet. However, due to the complexity and diversity of cleaved PARP1 fragments it is difficult to associate them to a specific PARP1-controlled process including parthanatos (Chaitanya et al., 2010; Galluzzi et al., 2014).

Conclusions

Lysosomes and LMP have been often connected with different types of cell death. While their major role in necrosis and autophagy/autophagic cell death is clear, their role in programmed cell death pathways seems to be more restricted to amplification of the different pathways, rather than to their initiation. The only real exception is apoptosis triggered by lysosomotropics, however, this is not really a physiological pathway. Nevertheless, use of lysosomotropics may be beneficial at least as supportive therapy in several diseases, including cancer. However, additional studies are needed, before we will really understand this complex organelle and its role in general, not only in cell death.

Acknowledgment: This work was supported by grant P1-0140 from Slovenian Research Agency to B.T.

References

- Aits, S. and Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1905–1912.
- Appelmans, F., Wattiaux, R., and de Duve, D. (1955). Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem. J.* 59, 438–445.
- Appelqvist, H., Waster, P., Kagedal, K., and Ollinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 214–226.
- Arias, E. and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 184–189.
- Ashoor, R., Yafawi, R., Jessen, B., and Lu, S. (2013). The contribution of lysosomotropism to autophagy perturbation. *PLoS One* 8, e82481.
- Averette, K.M., Pratt, M.R., Yang, Y., Bassilian, S., Whitelegge, J.P., Loo, J.A., Muir, T.W., and Bradley, K.A. (2009). Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PLoS One* 4, e7913.
- Blomgran, R., Zheng, L., and Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1213–1223.
- Bogdan, A.R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., and Tsuji, Y. (2016). Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem. Sci.* 41, 274–286.
- Bojic, L., Petelin, A., Stoka, V., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, V., and Turk, B. (2007). Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 581, 5185–5190.
- Brojatsch, J., Lima, H., Jr., Palliser, D., Jacobson, L.S., Muehlbauer, S.M., Furtado, R., Goldman, D.L., Lisanti, M.P., and Chandran, K. (2015). Distinct cathepsins control necrotic cell death mediated by pyroptosis inducers and lysosome-destabilizing agents. *Cell Cycle* 14, 964–972.
- Butinar, M., Prebanda, M.T., Rajkovic, J., Jeric, B., Stoka, V., Peters, C., Reinheckel, T., Kruger, A., Turk, V., Turk, B., et al. (2014). Stefin B deficiency reduces tumor growth via sensitization of tumor cells to oxidative stress in a breast cancer model. *Oncogene* 33, 3392–3400.
- Chaitanya, G.V., Steven, A.J., and Babu, P.P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal* 8, 31.
- Cheng, T., van Vlijmen-Willems, I.M., Hitomi, K., Pasch, M.C., van Erp, P.E., Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P.L. (2009). Colocalization of cystatin M/E and its target proteases suggests a role in terminal differentiation of human hair follicle and nail. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1232–1242.
- Ciechanover, A. (2012). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochim. Biophys. Acta.* 1824, 3–13.
- Cirman, T., Oresic, K., Droga-Mazovec, G., Turk, V., Reed, J.C., Myers, R.M., Salvesen, G.S., and Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J. Biol. Chem.* 279, 3578–3587.
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., and Simon, H.U. (2008). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J. Exp. Med.* 205, 685–698.
- Cookson, B.T. and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9, 113–114.
- Costanzo, A., Fausti, F., Spallone, G., Moretti, F., Narcisi, A., and Botti, E. (2015). Programmed cell death in the skin. *Int. J. Dev. Biol.* 59, 73–78.
- Cuervo, A.M. and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.
- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., and Turk, B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* 40, 1671–1678.
- de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137, 391–397.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.C., and Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535, 111–116.
- Dixon, S.J. and Stockwell, B.R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* 10, 9–17.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060–1072.
- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J. Biol. Chem.* 283, 19140–19150.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357–1361.

- Duncan, J.A., Gao, X., Huang, M.T., O'Connor, B.P., Thomas, C.E., Willingham, S.B., Bergstralh, D.T., Jarvis, G.A., Sparling, P.F., and Ting, J.P. (2009). *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J. Immunol.* 182, 6460–6469.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833, 3471–3480.
- Eskelinen, E.L. and Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 664–673.
- Fillicko-O'Hara, J., Grosso, D., Flomenberg, P.R., Friedman, T.M., Brunner, J., Drobyski, W., Ferber, A., Kakhniashvili, I., Keever-Taylor, C., Mookerjee, B., et al. (2009). Antiviral responses following L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLME)-treated lymphocyte infusions: graft-versus-infection without graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow. Transplant.* 15, 1609–1619.
- Fuchs, R. and Blaas, D. (2010). Uncoating of human rhinoviruses. *Rev. Med. Virol.* 20, 281–297.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., and Kroemer, G. (2014). Organelle-specific initiation of cell death. *Nat. Cell Biol.* 16, 728–736.
- Ghosh, M., Carlsson, F., Laskar, A., Yuan, X.M., and Li, W. (2011). Lysosomal membrane permeabilization causes oxidative stress and ferritin induction in macrophages. *FEBS Lett.* 585, 623–629.
- Gomez-Sintes, R., Ledesma, M.D., and Boya, P. (2016). Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Res. Rev.* doi: 10.1016/j.arr.2016.02.009.
- Guicciardi, M.E., Leist, M., and Gores, G.J. (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23, 2881–2890.
- Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21, 677–687.
- Hafner Česen, M., Pegan, K., Špes, A., and Turk, B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp. Cell Res.* 318, 1245–1251.
- Hafner Česen, M., Repnik, U., Turk, V., and Turk, B. (2013). Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes. *Cell Death Dis.* 4, e818.
- Hafner Česen, M., Stoka, V., and Turk, B. (2016). Role of lysosomes in intracellular degradation. In: *Encyclopedia of Cell Biology, Molecular Cell Biology*, Vol. 1. R.A. Bradshaw and P.D. Stahl, eds. (San Diego: Elsevier), pp. 612–620.
- Heid, M.E., Keyel, P.A., Kamga, C., Shiva, S., Watkins, S.C., and Salter, R.D. (2013). Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J. Immunol.* 191, 5230–5238.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., et al. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 11, 550–563.
- Henke, N., Albrecht, P., Bouchachia, I., Ryazantseva, M., Knoll, K., Lewerenz, J., Kaznacheyeva, E., Maher, P., and Methner, A. (2013). The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis.* 4, e470.
- Hernandez, L., KIM, M.K., Noonan, A.M., Sagher, E., Kohlhammer, H., Wright, G., Lyle, L.T., Steeg, P.S., Anver, M., Bowtell, D.D., et al. (2015). A dual role for Caspase8 and NF- κ B interactions in regulating apoptosis and necroptosis of ovarian cancer, with correlation to patient survival. *Cell Death Discovery* 1, 15053. doi:10.1038/cddiscovery.2015.53.
- Hohn, A. and Grune, T. (2013). Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 1, 140–144.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.
- Houseweart, M.K., Vilaythong, A., Yin, X.M., Turk, B., Noebels, J.L., and Myers, R.M. (2003). Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an *in vivo* model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Cell Death Differ.* 10, 1329–1335.
- Hu, Y.B., Dammer, E.B., Ren, R.J., and Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl. Neurodegener.* 4, 18.
- Hung, Y.H., Chen, L.M., Yang, J.Y., and Yang, W.Y. (2013). Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat. Commun.* 4, 2111.
- Jansen, P.A., van den Bogaard, E.H., Kersten, F.F., Oostendorp, C., van Vlijmen-Willems, I.M., Oji, V., Traupe, H., Hennies, H.C., Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P.L. (2012). Cystatin M/E knockdown by lentiviral delivery of shRNA impairs epidermal morphogenesis of human skin equivalents. *Exp. Dermatol.* 21, 889–891.
- Jiang, P. and Mizushima, N. (2014). Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 24, 69–79.
- Johansson, A.C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kagedal, K., Roberg, K., and Ollinger, K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis* 15, 527–540.
- Ju, X., Yan, Y., Liu, Q., Li, N., Sheng, M., Zhang, L., Li, X., Liang, Z., Huang, F., Liu, K., et al. (2015). Neuraminidase of influenza A virus binds lysosome-associated membrane proteins directly and induces lysosome rupture. *J. Virol.* 89, 10347–10358.
- Kaminsky, V. and Zhivotovsky, B. (2012). Proteases in autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1824, 44–50.
- Karlsson, M., Frennesson, C., Gustafsson, T., Brunk, U.T., Nilsson, S.E., and Kurz, T. (2013). Autophagy of iron-binding proteins may contribute to the oxidative stress resistance of ARPE-19 cells. *Exp. Eye Res.* 116, 359–365.
- Kaur, J. and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.
- Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q.T., et al. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 666–671.
- Kirkegaard, T. and Jaattela, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 746–754.
- Kubota, C., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H., and Takeuchi, T. (2010). Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *J. Biol. Chem.* 285, 667–674.
- Kurz, T., Terman, A., and Brunk, U.T. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 220–230.
- Kurz, T., Eaton, J.W., and Brunk, U.T. (2011). The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1686–1697.

- Lamkanfi, M. and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022.
- Li, W., Yuan, X., Nordgren, G., Dalen, H., Dubowchik, G.M., Firestone, R.A., and Brunk, U.T. (2000). Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett.* 470, 35–39.
- Li, W.W., Li, J., and Bao, J.K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136.
- Lima, H., Jr., Jacobson, L.S., Goldberg, M.F., Chandran, K., Diaz-Griffero, F., Lisanti, M.P., and Brojtsch, J. (2013). Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle* 12, 1868–1878.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., and Declercq, W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis* 14, 549–569.
- Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., and Piper, R.C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 113, 1515–1524.
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., et al. (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* 32, 2336–2347.
- Maier, O., Galan, D.L., Wodrich, H., and Wiethoff, C.M. (2010). An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature. *Virology* 402, 11–19.
- Marino, J., Garcia Vior, M.C., Furmento, V.A., Blank, V.C., Awruch, J., and Roguin, L.P. (2013). Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2553–2562.
- McComb, S., Shutinoski, B., Thurston, S., Cessford, E., Kumar, K., and Sad, S. (2014). Cathepsins limit macrophage necroptosis through cleavage of Rip1 kinase. *J. Immunol.* 192, 5671–5678.
- Miller, D.K., Griffiths, E., Lenard, J., and Firestone, R.A. (1983). Cell killing by lysosomotropic detergents. *J. Cell Biol.* 97, 1841–1851.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.
- Mrschlik, M. and Ryan, K.M. (2015). Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *FEBS J.* 282, 1858–1870.
- Newman, Z.L., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2009). CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infect. Immun.* 77, 4327–4336.
- Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P.G., Buellesbach, J., and Borner, C. (2010). Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ.* 17, 1167–1178.
- Ofengeim, D. and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signaling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 727–736.
- Ostenfeld, M.S., Fehrenbacher, N., Hoyer-Hansen, M., Thomsen, C., Farkas, T., and Jaattela, M. (2005). Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer Res.* 65, 8975–8983.
- Ostenfeld, M.S., Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Fehrenbacher, N., Olsen, O.D., Groth-Pedersen, L., Puustinen, P., Kirkegaard-Sorensen, T., Nylandsted, J., Farkas, T., et al. (2008). Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy* 4, 487–499.
- Parenti, G., Andria, G., and Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu. Rev. Med.* 66, 471–486.
- Pasparakis, M. and Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517, 311–320.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1824, 22–33.
- Repnik, U., Hafner Cesen, M., and Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. *Mitochondrion* 19 (Pt A), 49–57.
- Saftig, P., Schroder, B., and Blanz, J. (2010). Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1420–1423.
- Sborgi, L., Ruhl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C.J., Muller, D.J., Broz, P., and Hiller, S. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* 35, 1766–1778.
- Serrano-Puebla, A. and Boya, P. (2016). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1371, 30–44.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296.
- Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G., and Di Fiore, P.P. (2012). Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiol. Rev.* 92, 273–366.
- Spes, A., Sobotic, B., Turk, V., and Turk, B. (2012). Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines. *Biol. Chem.* 393, 1417–1431.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., et al. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* 276, 3149–3157.
- Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.*
- Tan, S., Schubert, D., and Maher, P. (2001). Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top Med. Chem.* 1, 497–506.
- Terman, A. and Brunk, U.T. (2004). Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1400–1404.
- Thiele, D.L. and Lipsky, P.E. (1990). Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 83–87.
- Tosteson, M.T. and Chow, M. (1997). Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J. Virol.* 71, 507–511.
- Tseng, W.A., Thein, T., Kinnunen, K., Lashkari, K., Gregory, M.S., D'Amore, P.A., and Ksander, B.R. (2013). NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 110–120.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 785–799.
- Turk, B. and Turk, V. (2009). Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? *J. Biol. Chem.* 284, 21783–21787.
- Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* 20, 4629–4633.

- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1824, 68–88.
- Uchimoto, T., Nohara, H., Kamehara, R., Iwamura, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. (1999). Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. *Apoptosis* 4, 357–362.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 17, 922–930.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.
- Vasiljeva, O. and Turk, B. (2008). Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie* 90, 380–386.
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., and Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Design* 13, 387–403.
- Vasiljeva, O., Korovin, M., Gajda, M., Brodoefel, H., Bojic, L., Kruger, A., Schurigt, U., Sevenich, L., Turk, B., Peters, C., et al. (2008). Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. *Oncogene* 27, 4191–4199.
- Villamil Giraldo, A.M., Appelqvist, H., Ederth, T., and Ollinger, K. (2014). Lysosomotropic agents: impact on lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1460–1464.
- Wallach, D., Kang, T.B., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2016). Programmed necrosis in inflammation: toward identification of the effector molecules. *Science* 352, aaf2154.
- Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S., Thirion, J., Gasingirwa, M.C., and Jadot, M. (2007). Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *Biochem J* 403, 89–95.
- Willingham, S.B., Bergstralh, D.T., O'Connor, W., Morrison, A.C., Taxman, D.J., Duncan, J.A., Barnoy, S., Venkatesan, M.M., Flavell, R.A., Deshmukh, M., et al. (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host. Microbe* 2, 147–159.
- Xu, H., and Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 57–80.
- Yamashima, T. (2004). Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36, 285–293.
- Young, M.M., Kester, M., and Wang, H.G. (2013). Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J. Lipid. Res.* 54, 5–19.
- Yu, F., Chen, Z., Wang, B., Jin, Z., Hou, Y., Ma, S., and Liu, X. (2016). The role of lysosome in cell death regulation. *Tumour Biol.* 37, 1427–1436.
- Zeeuwen, P.L. (2004). Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 761–773.
- Zeeuwen, P.L., van Vlijmen-Willems, I.M., Hendriks, W., Merckx, G.F., and Schalkwijk, J. (2002). A null mutation in the cystatin M/E gene of ichu mice causes juvenile lethality and defects in epidermal cornification. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2867–2875.
- Zeeuwen, P.L., Cheng, T., and Schalkwijk, J. (2009). The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1327–1338.
- Zeeuwen, P.L., van Vlijmen-Willems, I.M., Cheng, T., Rodijk-Olthuis, D., Hitomi, K., Hara-Nishimura, I., John, S., Smyth, N., Reinheckel, T., Hendriks, W.J., et al. (2010). The cystatin M/E-cathepsin L balance is essential for tissue homeostasis in epidermis, hair follicles, and cornea. *FASEB J.* 24, 3744–3755.
- Zhou, Q., and Salvesen, G.S. (1997). Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem. J.* 324, 361–364.
- Zou, J., Kawai, T., Tsuchida, T., Kozaki, T., Tanaka, H., Shin, K.S., Kumar, H., and Akira, S. (2013). Poly IC triggers a cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity* 38, 717–728.

Nežka Kavčič^a, Katarina Pegan^a, Peter Vandenabeele and Boris Turk^{*}

Comparative study of the differential cell death protecting effect of various ROS scavengers

<https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0317>

Received December 19, 2017; accepted July 5, 2018

Abstract: Oxidative stress has for a long time been associated with cell death, especially classical necrosis, however, its role in other cell death pathways is less clear. Here, we evaluated in a comparative way, the effect of four different reactive oxygen species (ROS) scavengers, N-acetyl-L-cysteine (NAC), α -tocopherol and two superoxide dismutase mimetics, n(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride, and 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (Tempol), in four different cell death models, including menadione-triggered necrosis, staurosporine-induced apoptosis and tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis and necroptosis. While menadione-triggered necrosis was completely prevented by the classical ROS scavenger NAC and to a substantial amount by the other scavengers, ROS targeting was found to have a marginal effect on the other cell death modalities investigated. Despite its side-effects at higher concentrations, Tempol was able to substantially prevent TNF-induced apoptosis and to a somewhat lesser extent TNF-induced necroptosis. However, this seems to be separated from its ROS-scavenging function.

Keywords: apoptosis; cell death; necroptosis; necrosis; ROS; ROS scavenger; Tempol.

Introduction

Oxidative stress is a consequence of the excessive production of reactive oxygen species (ROS), resulting from the disruption of redox signalling. ROS are mainly produced in peroxisomes and mitochondria (Morgan and Liu, 2010; Brown and Borutaite, 2012; Kaminsky and Zhivotovsky, 2014) where electrons escape from the electron respiratory chain complexes to react with molecular oxygen (O_2), resulting in generation of the reactive superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) (Zoccarato et al., 2007; Stowe and Camara, 2009; Kuksal et al., 2017). $O_2^{\cdot-}$ is then rapidly transformed into oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) by superoxide dismutase (SOD), a reaction that is very important in the mitochondrial matrix (Luo et al., 2009; Wilcox, 2010; Moloney and Cotter, 2018). Finally, H_2O_2 is decomposed by glutathione (GSH) peroxidase or catalase. SOD, GSH peroxidase, catalase and several vitamins (E, C, beta-carotene) are therefore considered the primary cellular oxidant defence system (Stowe and Camara, 2009; Moloney and Cotter, 2018). However, when this defence system is overloaded, enhanced ROS production impairs mitochondria energy metabolism and triggers cell death (Ott et al., 2007; Kuksal et al., 2017).

Therefore, preventing the harmful effects of ROS on human health by various antioxidants has a very long history. Among the antioxidants perhaps the best known is the GSH precursor N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Bavarsad Shahripour et al., 2014; Rushworth and Megson, 2014). Another well-known antioxidant is α -tocopherol (α TOC), a form of vitamin E which, as other tocopherols, protects phospholipids from peroxidation by concentrating in lipid bilayers, thereby interrupting the free radical chain reaction of lipid peroxidation and also protects cells from ferroptosis (Traber and Stevens, 2011; Angeli et al., 2017). Very potent antioxidants are also SOD mimetics. One such cell permeable SOD mimetic is n(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride (MnTBAP) with a low charge, which enables its penetration into mitochondria (Salvemini et al., 2002; Stowe and Camara, 2009). Its antioxidant properties depend on manganese electron deficiency and the compound can also react with $ONOO^-$, ClO^- , and $CO_3^{\cdot-}$ (Batinic-Haberle et al., 2011). Another SOD mimetic is 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl

^aNežka Kavčič and Katarina Pegan: These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author: Boris Turk**, Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, Ljubljana SI-1000, Slovenia; and Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Ljubljana SI-1000, Slovenia, e-mail: boris.turk@ijs.si

Nežka Kavčič: Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, Ljubljana SI-1000, Slovenia; and International Postgraduate School Jožef Stefan, Jamova 39, Ljubljana SI-1000, Slovenia

Katarina Pegan: Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, Ljubljana SI-1000, Slovenia

Peter Vandenabeele: VIB Center for Inflammation Research, VIB, Technologiepark, 9052 Ghent, Belgium; and Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Technologiepark, 9052 Ghent, Belgium

(Tempol), an ampholyte and a redox-cycling nitroxide, which dismutates $O_2^{\cdot -}$ and restrains the Fenton reaction by preventing the generation of $^{\cdot}OH$ radicals (Luo et al., 2009; Wilcox, 2010; Dikalova et al., 2015). However, due to its catalase-like activity Tempol is not only a SOD mimetic (Soule et al., 2007; Wilcox, 2010).

While ROS are known to play a critical role in necrosis, their role in other cell death modalities, including apoptosis and various types of programmed necrosis is less well clear (Kaminsky and Zhivotovsky, 2014; Galluzzi et al., 2018; Moloney and Cotter, 2018). The major aims of this study were to study the role of ROS in four different models of cell death, tumor necrosis factor (TNF)-induced

apoptosis and necroptosis, staurosporine-induced apoptosis and menadione-induced necrosis, and to simultaneously evaluate the efficacy of four different antioxidants, NAC, α TOC and SOD mimetics MnTBAP and Tempol, in preventing ROS generation and cell death. ROS were thus found to have a major role in menadione-triggered necrosis, which was completely prevented by NAC and to a somewhat lesser extent by MnTBAP and α TOC. In contrast, ROS were found not to be critical for TNF-mediated apoptosis and necroptosis and staurosporine-induced apoptosis. The efficacy of Tempol as an antioxidant is very difficult to evaluate, as it exhibited differential effects, depending on the concentration used. Anyhow,

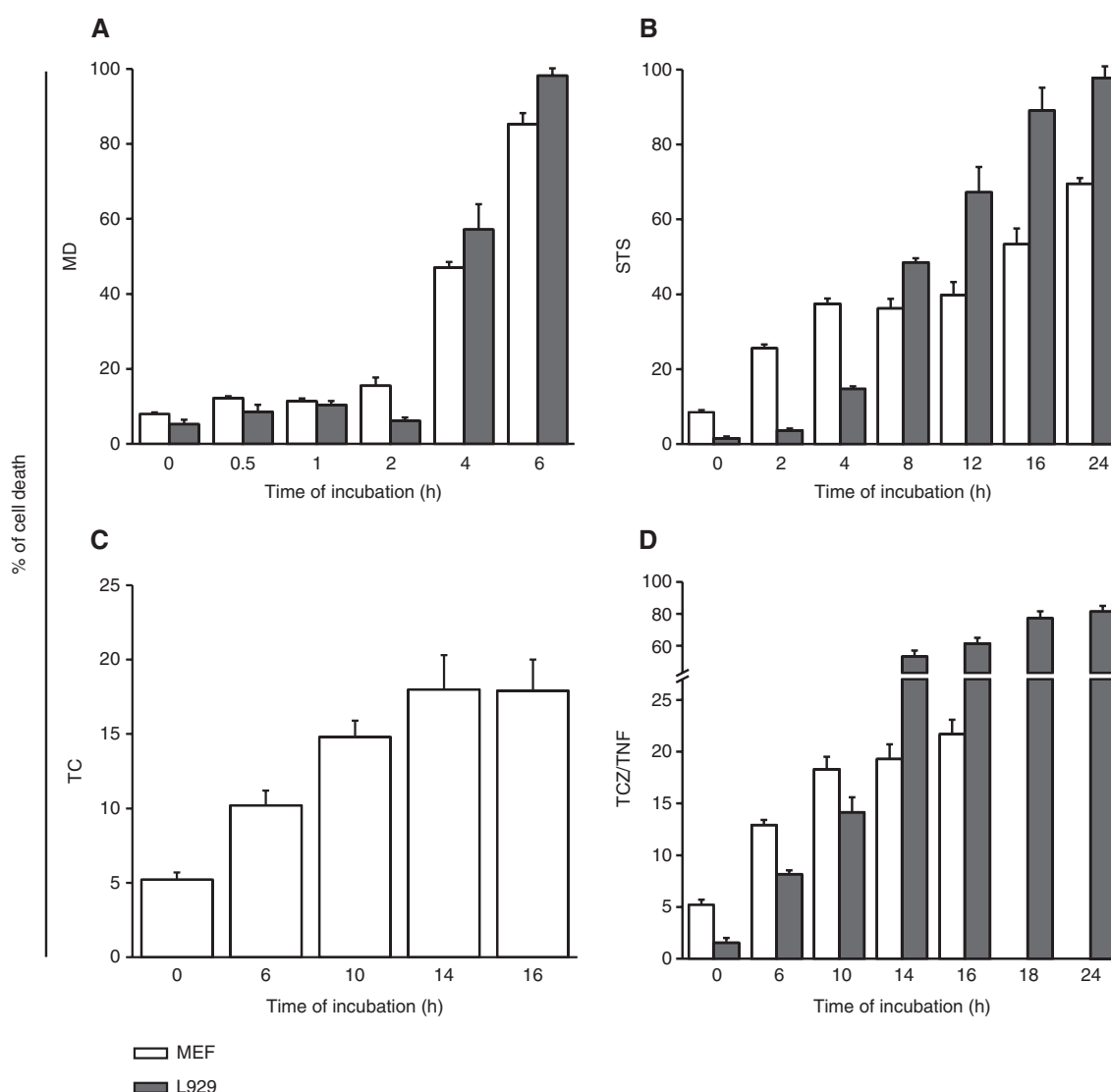


Figure 1: Different types of cell death in MEFs and L929.

Percentage of cell death after treating either MEFs or L929 (A) with $75 \mu M$ MD, (B) $1 \mu M$ STS, (C) TC (100 ng/ml TNF, $1 \mu g/ml$ CHX) and (D) TCZ (100 ng/ml TNF, $1 \mu g/ml$ CHX, $20 \mu M$ zVAD-fmk) or in case of L929 TNF only (10 ng/ml TNF). Results are representative of three independent experiments. Bars represent means + standard deviation.

at high concentrations Tempol was able to almost completely prevent TNF-mediated apoptosis and partially also necroptosis, but the mechanism remains elusive.

Results

Generation of ROS in different cell death models

In the initial experiments, we evaluated the progress of cell death in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and L929 cells using four different cell death stimuli. MEFs

were treated with menadione sodium bisulfite (MD), staurosporine from *Streptomyces* sp. (STS) and TNF in combination with cycloheximide (CHX) in the absence (TNF/CHX; TC) or presence of zVAD-fmk (TNF/CHX/zVAD; TCZ), and the progression of cell death was then monitored by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. A similar experiment was done with L929 cells, except that in the case of TNF, CHX was omitted as cells died rapidly by necroptosis even in the absence of zVAD-fmk (data not shown) (Vercammen et al., 1998b). MD triggered cell death extremely rapidly and essentially all cells were dead in 6 h post-treatment (Figure 1A). Cell death was necrotic in both cell types as judged by the presence of AnnexinV-PE- and PI-double-positive cells and the lack

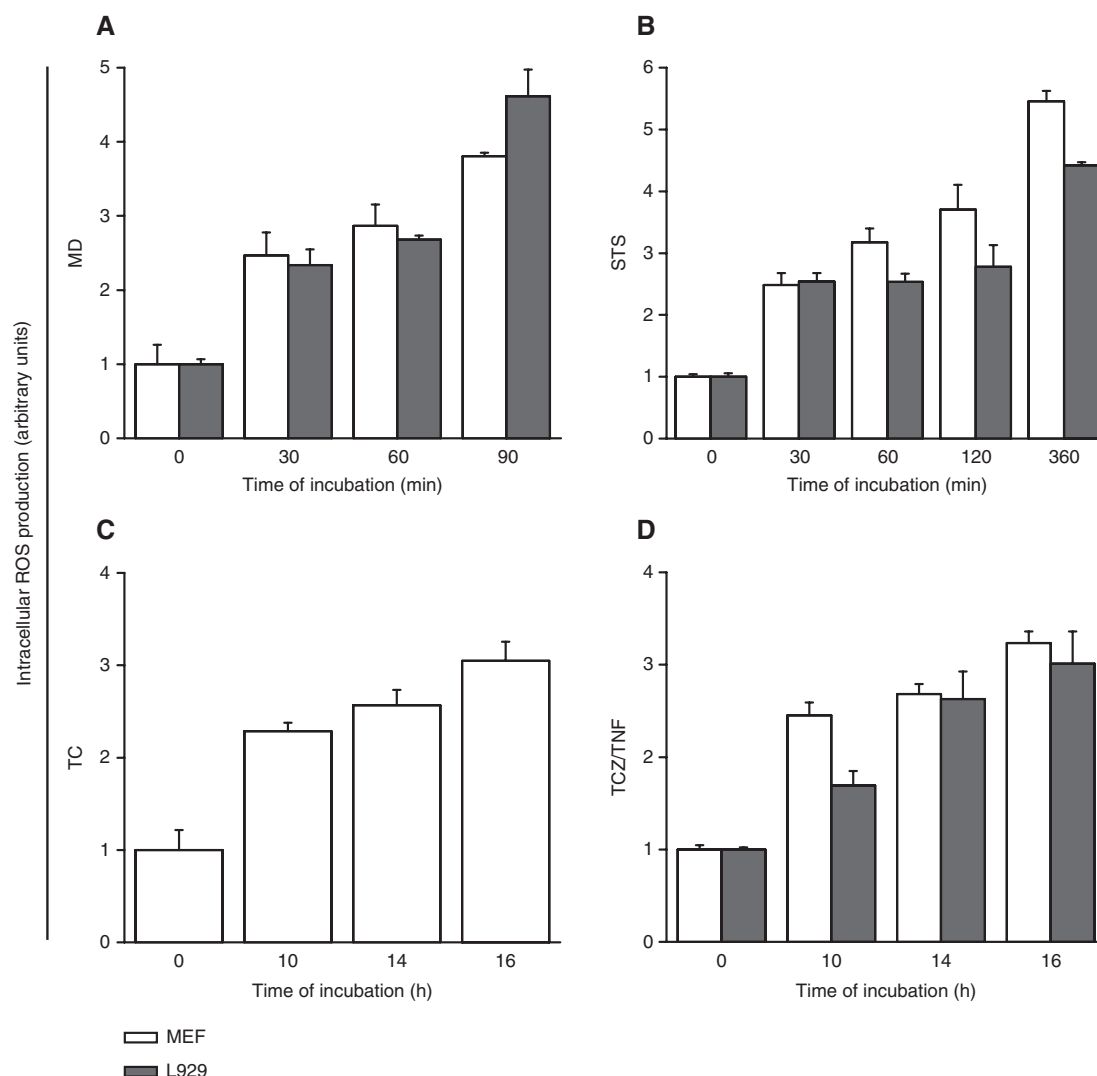


Figure 2: Cell death inducers affect intracellular ROS production before increasing cell death in MEFs and L929 cells.

Intracellular ROS production during treatment with (A) 75 μ M MD, (B) 1 μ M STS, (C) TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) and (D) TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD-fmk) or in case of L929 TNF only (10 ng/ml TNF). Results are representative of three independent experiments. Bars represent means + standard deviation.

of caspase-like activity (Supplementary Figures 1 and 2). Cell death triggered by STS was apoptotic, as judged by both FACS analysis and caspase activation (Supplementary Figures 1 and 2), and a vast majority of cells died within 24 h, although cells started to die already 2–4 h post-treatment (Figure 1). Cell death triggered by TNF was apoptotic in MEFs (Figure 1, Supplementary Figures 1 and 2), whereas in L929 cells it was completely necroptotic (Figure 1, Supplementary Figure 1), in agreement with earlier results (Vercammen et al., 1997, 1998a; Degterev et al., 2005; Vanden Berghe et al., 2010). Also MEFs died with necroptotic characteristics, when treated with TNF/CHX in the presence of zVAD, although they were substantially less sensitive to the stimulus than L929 cells (Figure 1; Supplementary Figure 1).

Next, we monitored the progression of intracellular ROS production in the same cell death models as above.

All treatments resulted in a time-dependent increase in intracellular ROS production (Figure 2). However, while this increase was rapid following MD or STS treatments, several hours were needed to detect intracellular ROS increase following TNF treatments (Figure 2). Furthermore, an increase in ROS by both MD and STS preceded cell death (Figures 1A,B and 2A,B), whereas in all TNF treatments ROS increase was found to accompany cell death (Figure 2C,D). This further suggested that ROS could be of major importance in cell death following MD, and, possibly, STS treatment, but probably not in TNF-triggered cell death. In order to confirm the increase of intracellular ROS, we next evaluated the level of mitochondrial ROS generated using MitoSOX staining. Similarly, as for total ROS generation, mitochondrial ROS generation progressively increased with time and was the most pronounced following MD treatment (Supplementary Figure 3).

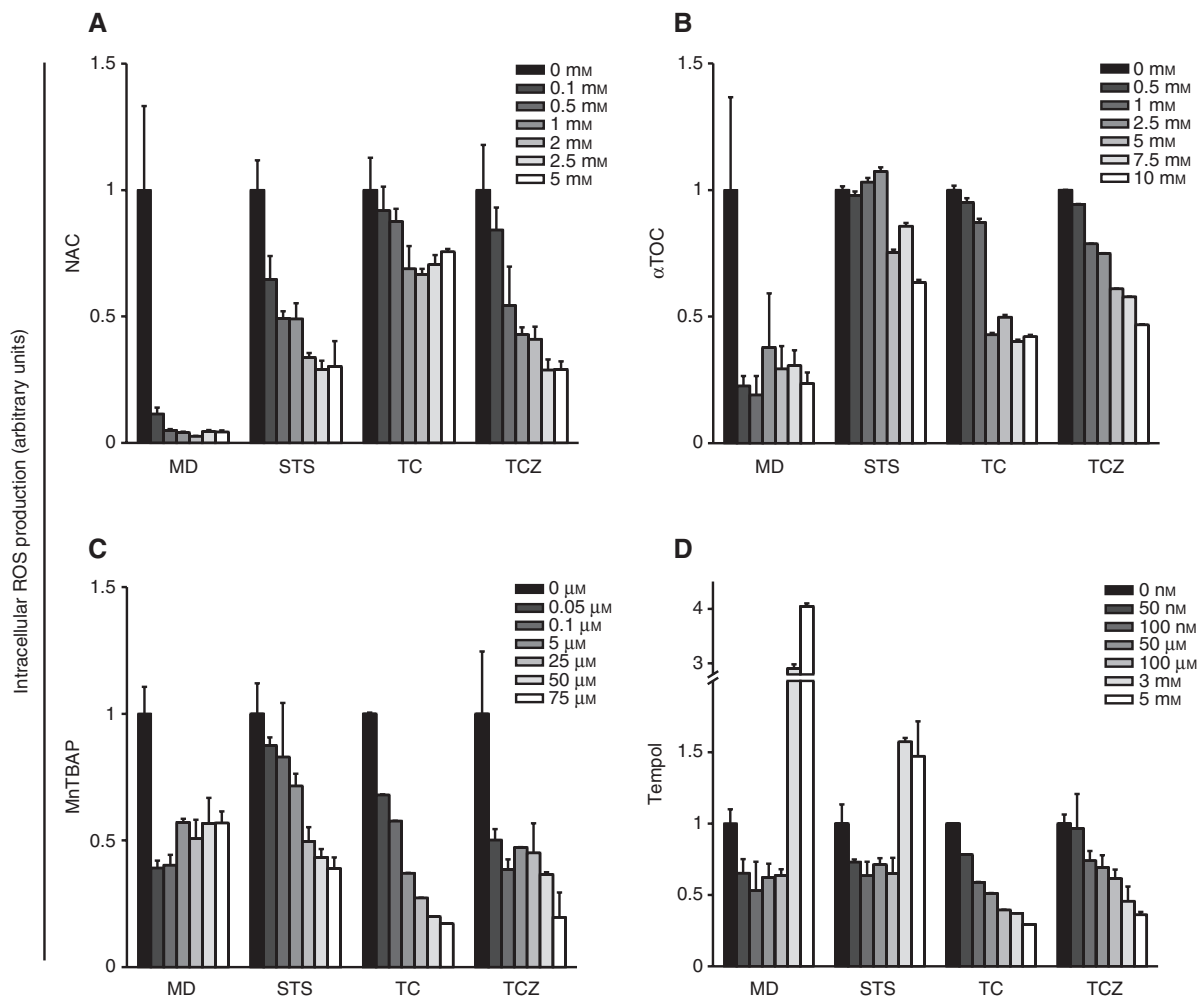


Figure 3: The effect of tested antioxidants on induced ROS production in MEFs.

(A) NAC, (B) αTOC, (C) MnTBAP and (D) TE efficiency in decreasing total intracellular ROS production induced by 30 min incubation with 75 μM MD, 1 μM STS, 14 h incubation with TC (100 ng/ml TNF, 1 μg/ml CHX) and TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μg/ml CHX, 20 μM zVAD-fmk). The data represent the mean values + standard deviation based on experiments that were performed in triplicate.

Efficacy of antioxidants in scavenging ROS in different cell death models

Having shown that ROS are generated in all four cell death models, though with different kinetics and intensities, we next investigated the capacity of four ROS scavengers with different mechanisms of action to scavenge ROS. As ROS generation was observed at different time points, depending on the cell death model, we measured the effect of scavengers at a time point when a substantial ROS increase was observed. In line with this, the following times were therefore selected: 30 min post MD and STS treatment and 14/18 h post TNF treatment for MEF/L929 cells, respectively. All four scavengers, NAC, α TOC, MntBAP, and Tempol, were found to at least partially scavenge ROS in MEFs, regardless of the stimulus (Figure 3).

NAC was extremely efficient in eliminating ROS at all concentrations following MD treatment (>90%), but showed moderate to low efficacy in scavenging ROS in other cell death models (~30–70%; Figure 3A). α TOC was the least efficient among all scavengers, regardless of the stimulus [~30–70% (MD); Figure 3B]. Both SOD mimetics, MntBAP and Tempol, exhibited moderate efficacy in scavenging ROS following MD or STS treatment (~40–60%), but were the most efficient in scavenging ROS in TNF-triggered apoptosis and necroptosis (~60–75%; Figure 3C,D). Interestingly, at high concentrations Tempol apparently increased ROS levels upon MD or STS treatment, but not

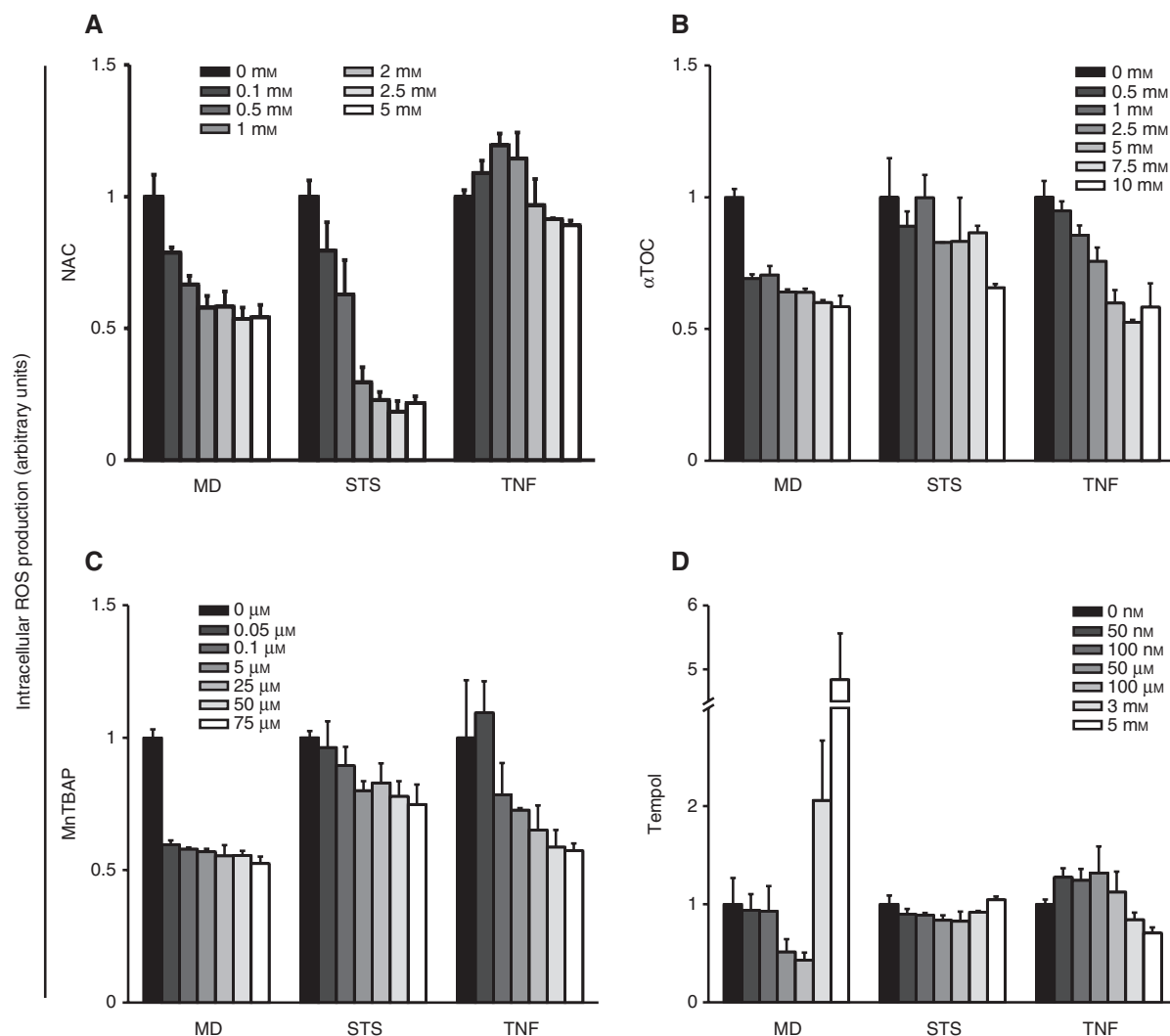


Figure 4: The effect of tested antioxidants on induced ROS production in L929 cells.

Cells were treated with 75 μ M MD, 1 μ M STS for 30 min and TNF (10 ng/ml TNF) for 18 h in the presence of (A) NAC, (B) α TOC, (C) MntBAP and (D) TE. Intracellular ROS production after treatment was measured by flow cytometry. Results are representative of three independent experiments. Bars represent means + standard deviation.

upon TNF treatments (Figure 3D). Similar results were also obtained in L929 cells, except that the scavenging efficiency of all four scavengers was considerably lower than in MEFs (Figure 4). Further increasing the scavenger concentrations in the cells used was not possible, as they were either cytotoxic (NAC), exhibited solubility problems (α TOC) or affected cellular granulation (MnTBAP).

As both MnTBAP and Tempol as SOD mimetics primarily scavenge mitochondrial ROS, we next compared their effect on scavenging mitochondrial ROS using MD to trigger oxidative stress (Supplementary Figure 4). While MnTBAP was capable of reducing mitochondrial ROS in both untreated and MD-treated cells, Tempol had no effect at low concentrations, but was instead found to also

increase mitochondrial ROS at high concentrations, consistent with its general capability to increase ROS (Lewinska et al., 2008).

We next evaluated the effect of antioxidants on intracellular ROS production for a prolonged period of time with all four inducers in both cell types (Supplementary Figures 5 and 6). NAC was still the most efficient, although it did not prevent ROS generation following TNF treatments, whereas the other ROS scavengers were slightly less efficient, demonstrating that they can provide a certain level of protection even at later time points. Again, Tempol exhibited the same behavior as at the early time point for all models, i.e. increased mitochondrial ROS at high concentrations.

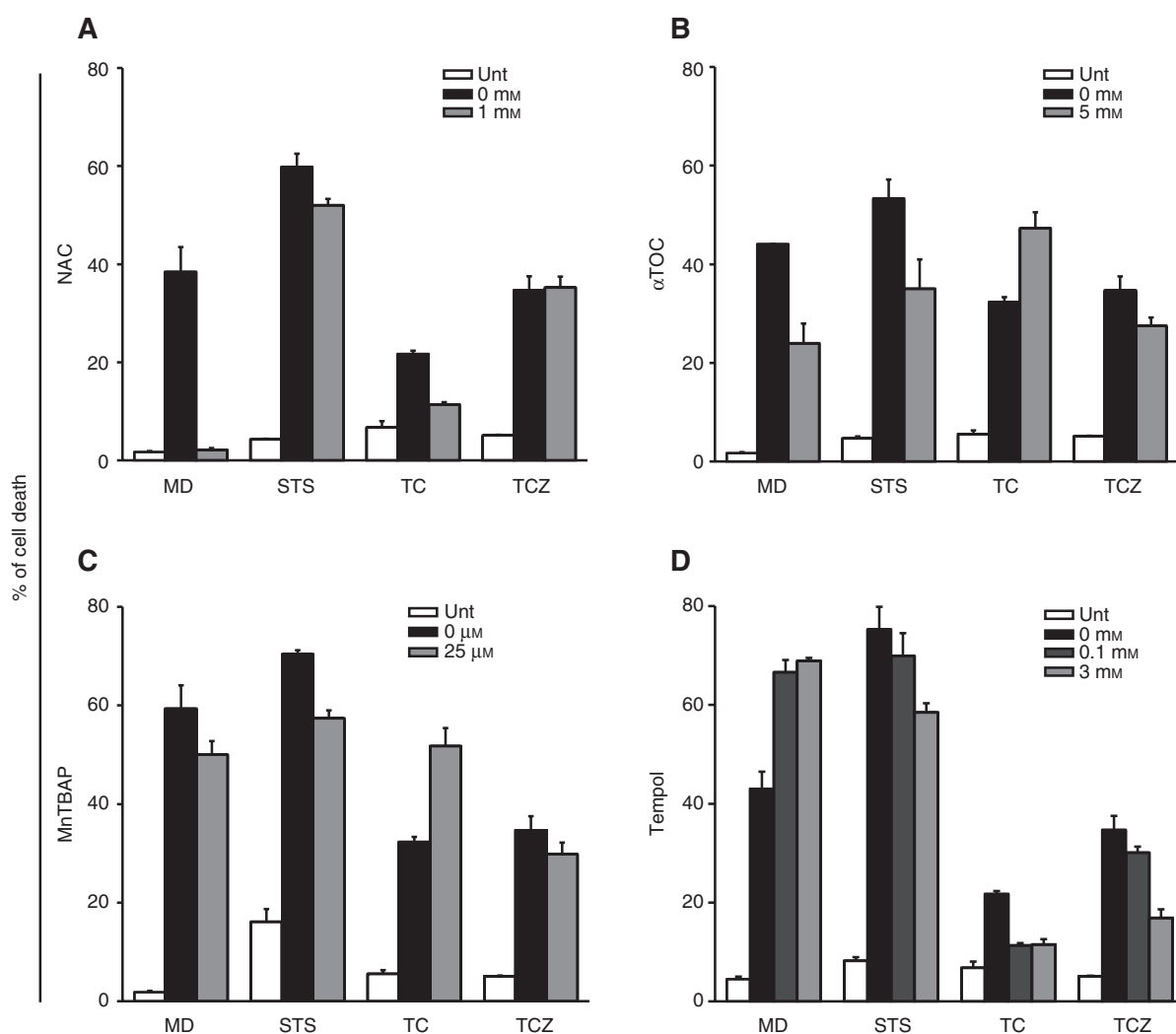


Figure 5: The effect of antioxidants on cell death in MEFs.

Prior to cell death induction, cells were treated with (A) 1 mM NAC, (B) 5 mM α TOC, (C) 25 μ M MnTBAP and (D) 0.1 mM and 3 mM TE as described in the Materials and methods section. Unt is an untreated control sample. Cell viability after 4 h incubation with 75 μ M MD, 24 h incubation with 1 μ M STS, 14 h incubation with TC (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX) and TCZ (100 ng/ml TNF, 1 μ g/ml CHX, 20 μ M zVAD-fmk) was monitored by flow cytometry. The data represent the mean values + standard deviation based on experiments that were performed in triplicate.

Differential effect of antioxidants on cell death

Next, we evaluated whether the ROS scavenging efficiency of the four scavengers is sufficient to prevent cell death at the same conditions as above. We therefore decided to use scavenger concentrations that were found to have a profound effect on ROS levels (1 mM NAC, 5 mM α TOC, 25 μ M MnTBAP, 0.1 and 3 mM Tempol) and did not exhibit any toxicity or solubility problems. NAC was by far the most efficient in completely preventing MD-induced necrosis, but showed moderate to very low efficiency in STS- and TNF-induced cell death, respectively. α TOC could partially prevent MD-induced necrosis, but was essentially ineffective in preventing other types of cell death. MnTBAP was the least efficient among all the scavengers and essentially exhibited no effect on cell death, regardless of the stimulus. Strikingly, Tempol was found to be toxic at

high concentrations upon MD treatment, but at the same concentrations conferred major protection against cell death following all TNF treatments. Interestingly, Tempol exhibited no protection against STS-induced apoptosis (Figures 5 and 6). We also examined the ability of ROS scavengers to provide long-term protection against cell death (Supplementary Figures 7 and 8). NAC blocked MD induced cell death, suggesting that ROS play a crucial role in MD-induced necrosis. However, in other treatments the scavengers used only delayed cell death, with an exception of Tempol, which provided excellent protection against TNF-mediated cell death both by apoptosis (TC) as by necroptosis.

In the final experiment, we therefore evaluated the ability of NAC to protect against Tempol-mediated ROS generation and cytotoxicity in MD-triggered cell death. As shown in Figure 7, 1 mM NAC was found to efficiently

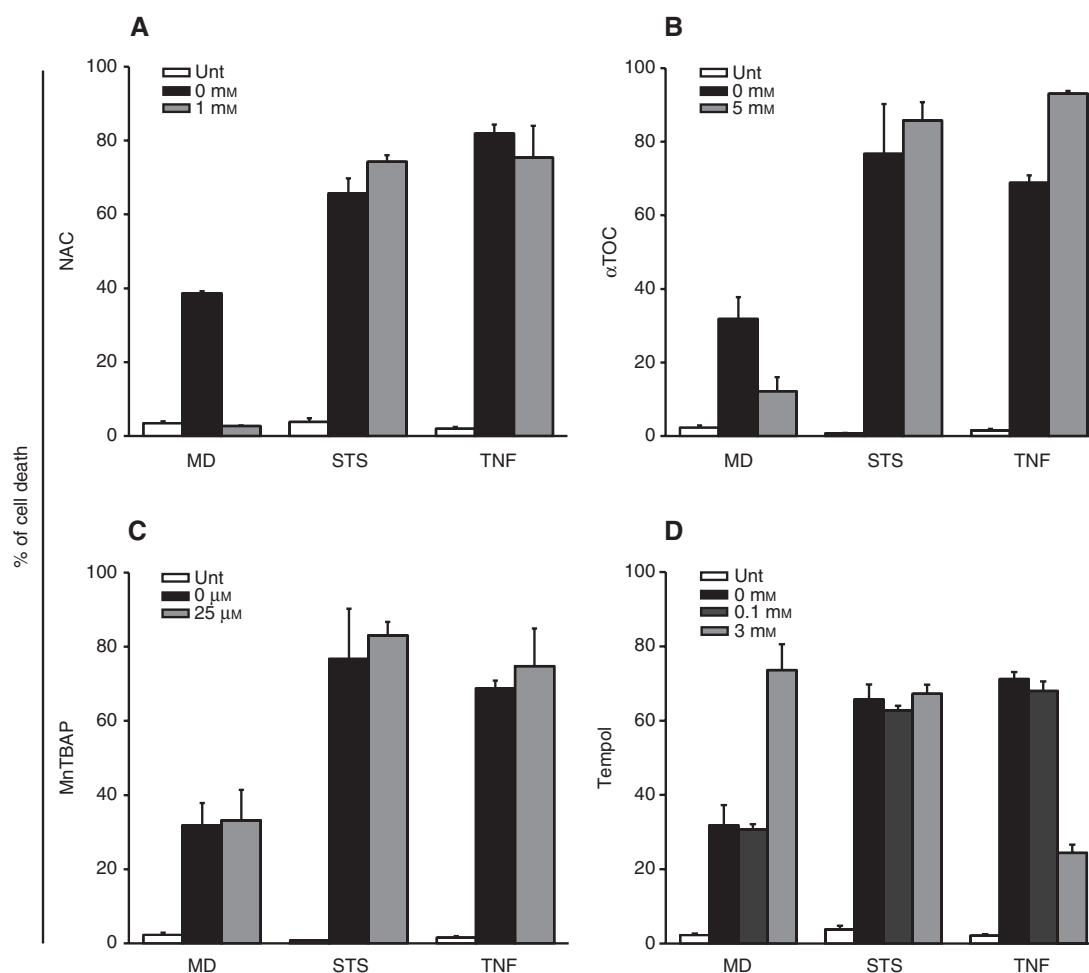


Figure 6: The effect of antioxidants on cell death in L929 cells.

Prior to cell death induction, cells were treated with (A) 1 mM NAC, (B) 5 mM α TOC, (C) 25 μ M MnTBAP and (D) 0.1 mM and 3 mM TE as described under Materials and methods, and then cell death was induced by 4 h incubation with 75 μ M MD, 16 h incubation with 1 μ M STS and 24 h incubation with TNF (10 ng/ml TNF). Unt is an untreated control sample. Cell viability was analyzed by flow cytometry using AnnexinV-PE and PI. Results are representative of three independent experiments. Bars represent means + standard deviation.

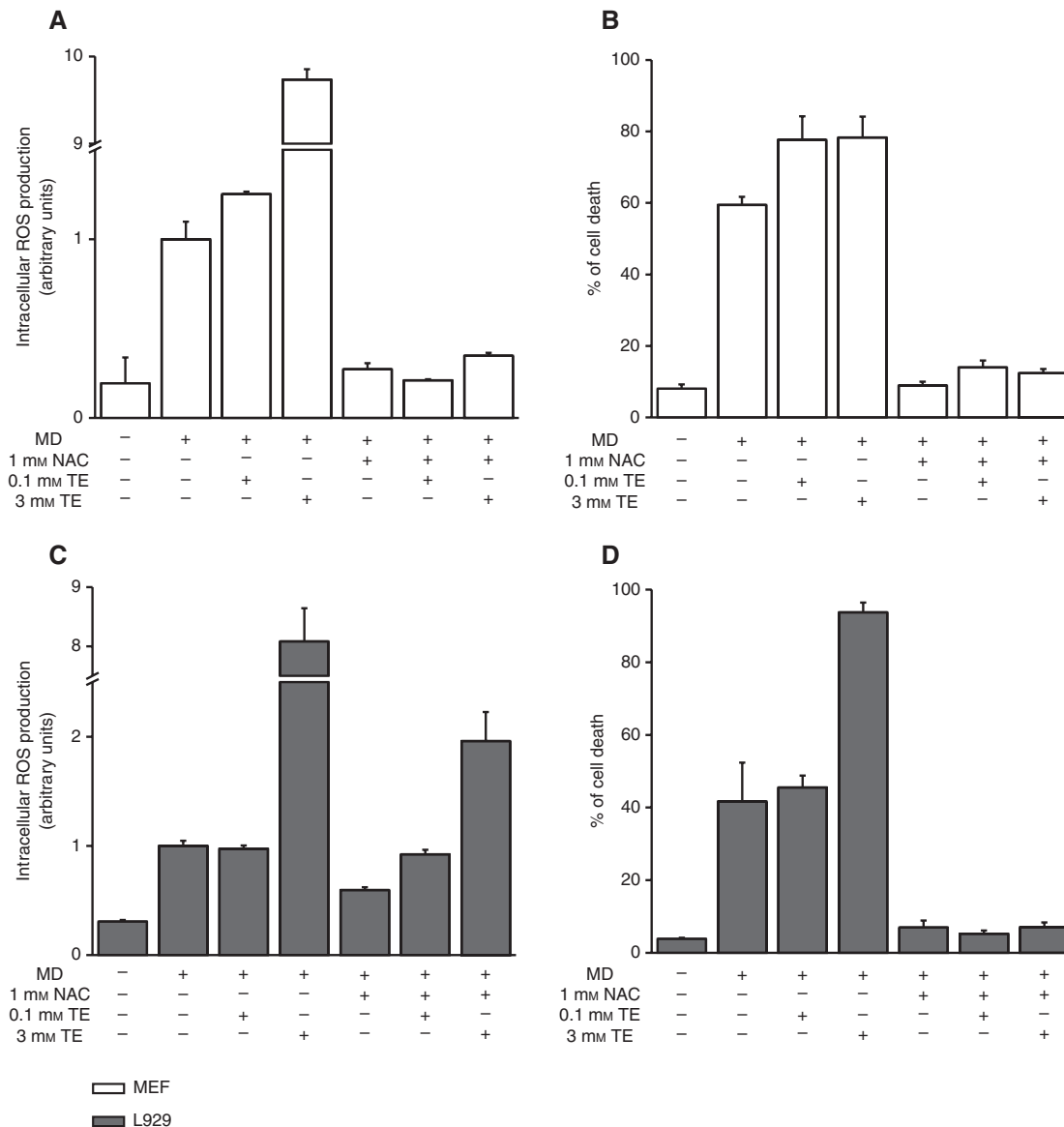


Figure 7: NAC inhibits Tempol's effect on intracellular ROS production and cell death.

(A) NAC efficiency of decreasing total intracellular ROS production induced by 0.1 mM and 3 mM TE, respectively, combined with 75 μ M MD (30 min long exposure) in MEFs. (B) NAC prevents cell death induced by 0.1 mM and 3 mM TE combined with 4 h 75 μ M MD treatment in MEFs. Cells were incubated with both antioxidants for 2 h prior to the addition of cell death stimulus where indicated. (C and D) A similar effect was observed also in L929 cells. The data represent the mean values + standard deviation based on experiments that were performed in triplicate.

scavenge all ROS in MEFs, while it exhibited a smaller effect on ROS generation in L929 cells. However, NAC completely protected against MD-induced cell death in both cell types, indicating the major capacity of NAC to prevent oxidative stress-mediated cell death.

Discussion

Here, we show that cell death induced by MD, STS or TNF in the presence or absence of CHX is accompanied

by intracellular ROS generation in MEFs and L929 cells, which was more pronounced in MEFs. MD was found to be the most efficient ROS inducer, inducing a major ROS burst already at the 1 h time-point, by far exceeding ROS generation by any other stimulus, including STS, where an increase of ROS was also evident at the 1 h time-point, but was much smaller (Figure 2). Furthermore, while ROS generation was really an early event preceding any signs of cell death in MD- and STS-induced cell death, a significant increase in ROS following all TNF treatments was only observed at the 10 h time-point, when cells

were already undergoing cell death, in line with previous results (Vanden Berghe et al., 2010). Interestingly, among all four ROS scavengers used, only NAC was able to completely scavenge ROS following MD treatment in MEFs, and to a lesser extent in L929 cells. However, none of the scavengers was able to completely neutralize ROS, generated by other stimuli, although the two SOD mimetics MnTBAP and Tempol, relatively efficiently scavenged ROS following TNF treatments, especially in MEFs (60–70%; Figure 3). This further suggests that not all ROS, generated by different cell death stimuli can be completely neutralized, despite the capacity of the scavengers, which was clearly not overcome, as demonstrated for the NAC-scavenging capacity of MD-generated ROS. However, this can be at least partially explained by the differential mechanism of action of the antioxidants. MD affects the respiratory chain rapidly and consequently resulting in H_2O_2 production, which can be neutralized by GSH peroxidase and NAC that can supplement GSH by donating a cysteine. Moreover, both oxidative stress and antioxidants, such as NAC, can activate the transcription factor NF- κ B (Murley et al., 2001; Moloney and Cotter, 2018), which in turn triggers expression of several antioxidant proteins, including MnSOD, catalase and GSH peroxidase that prevent further oxidative stress (Morgan and Liu, 2011; Moloney and Cotter, 2018). On the other hand, α TOC was not able to eliminate $O_2^{\cdot-}$ in permeabilized mitochondria (Kruglov et al., 2008), consistent with previous results showing α TOC as a poor $O_2^{\cdot-}$ scavenger in primary cultures of periglomerular vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin-II (Luo et al., 2009). On the other hand, α TOC can also prevent lipid peroxidation (Ott et al., 2007). Moreover, α TOC was shown to be able to considerably stabilize mitochondria and prevent against cardiolipin oxidation following siramesine treatment, which could not have been achieved by NAC (Cesen et al., 2013), clearly supporting the idea that not all ROS scavengers are efficient against all forms of oxidative stress. In contrast, the SOD mimetics are known to efficiently scavenge H_2O_2 that diffuses through membranes to other organelles due to its negative charge, resulting in additional production of ROS, including $O_2^{\cdot-}$ by non-mitochondrial oxidases. However, the reduction in oxidative stress is likely a combination of their SOD-like and peroxidase-like activities, which explains the best the behavior of MnTBAP (Dikalov and Harrison, 2006).

Although an SOD mimetic, Tempol exhibited a very unusual profile. At low concentrations ($<100 \mu M$), Tempol decreased ROS following MD and STS treatment

in MEFs (only MD in L929 cells), whereas at high concentrations ($\geq 3 mM$) increased intracellular ROS production was observed. Furthermore, Tempol even enhanced MD-triggered MitoSOX oxidation signal due to its ability to induce $O_2^{\cdot-}$. The reason for that might be in several ROS-scavenging mechanisms of Tempol in addition to its SOD-like activity (Samuni et al., 1988), including heme-mediated catalase-like activity (Krishna et al., 1996), radical chain reaction interruption (Nilsson et al., 1989), oxidation of reduced transitional metal ions in a Fenton type reaction (Soule et al., 2007), oxidation of semiquinone radicals (i.e. detoxification of xenobiotics) (Krishna et al., 1991; Samuni et al., 2002), and trapping carbon-centered chemicals (Krishna et al., 1991; Offer et al., 2000; Wilcox, 2010). In addition, at high concentrations, Tempol can act as an oxidant due to the accumulation of its oxidised form (Offer et al., 2000; Guo et al., 2015). This is also consistent with previous results demonstrating that Tempol was cytotoxic and genotoxic for cultured primary human lymphocytes (Lewinska et al., 2008; Guo et al., 2015). However, at the same concentrations, Tempol was the most efficient among all four antioxidants used in preventing TNF-mediated cell death. This cannot be explained solely by its antioxidant activity as MnTBAP, another SOD mimetic we used, showed only minor protection. This suggests that the effect is compound-specific, but the mechanism of action remains to be revealed. Consistent with this, Tempol was also found to effectively prevent cell death *in vivo* in a mouse model of TNF-induced systemic inflammatory response syndrome, a model for inflammation-induced hypotension and shock (Cauwels et al., 2010). Tempol also relieved mitochondrial dysfunction in hypoxic rats after TNF treatment, which was also accompanied by reduced NF- κ B transcription activity (Mariappan et al., 2007).

The exact role of ROS in cell death remains to be clarified. We demonstrated that ROS are critical mediators of necrosis triggered by MD (Ryter et al., 2007; Loor et al., 2010), whereas in other models this is more elusive. Although ROS are required for cardiolipin peroxidation, which is believed to be an important step in the release of cytochrome c from the mitochondrial membrane in apoptosis (Ryter et al., 2007; Moloney and Cotter, 2017; Sies et al., 2017), scavenging ROS did not rescue cells from STS- or TNF-mediated apoptosis. However, as we were unable to completely neutralize ROS by the antioxidants used, this can be also related to insufficient ROS scavenging or cell type used. In any case, ROS generation does not appear to be an early and critical event in TNF-mediated cell death pathways, so even a complete ROS neutralization is not

expected to prevent cell death, but rather delay it. This is supported by the findings that neither ROS nor mitochondria play a crucial role in the necroptosis execution. In line with this, Tait et al. found that necroptosis occurred also in the mitochondria-deficient cells after TNF stimulation (Tait et al., 2013). Similarly, it was reported that dimerisable MLKL can directly bind to the plasma membrane, causing permeabilization without interaction with mitochondria (Cai et al., 2014; Chen et al., 2014), suggesting at least that the final execution step of necroptosis does not require mitochondrial ROS production. This is also in agreement with previous suggestions that the use of antioxidants cannot completely prevent cell death because ROS are not the only trigger of cell death (Jarvis et al., 2007; Vanden Berghe et al., 2010; Vandenabeele et al., 2010). However, one cannot exclude the possibility that the effect is also cell type-specific.

Materials and methods

Reagents

MD, STS, (+/-) α TOC, Tempol/TE, NAC and cycloheximide (CHX) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK/zVAD) was obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland), whereas MnTBAP was purchased from MERCK Calbiochem (Darmstadt, Germany). CM-H₂DCFDA and MitoSOX were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Mouse recombinant TNF α (TNF) was prepared as described previously (Vanden Berghe et al., 2010).

Cells

wt MEFs were prepared from 12.5 to 13.5-day-old FVB/N mouse embryos as described (Xu, 2005) and seeded in 6-well plates at the 4th passage for the experiments. Mice were used in accordance with protocols approved by the Veterinary Administration of the Republic of Slovenia and the government Ethical Committee. Procedures for animal care and use were in accordance with the 'PHS Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals' and the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals'. The L929 murine aneuploidy fibrosarcoma cell line was obtained from ECACC and was selected because of its sensitivity to undergo necroptosis. All cells were cultured in 1x DMEM (Invitrogen, Gibco, Waltham, MA, USA) supplied with 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% glutamax (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Before the experiments, cultured cells were washed with phosphate buffer saline (PBS; Lonza, Basel, Switzerland). Next, cell death inducers were added, followed by monitoring of ROS generation and cell death progression up to 48 h, depending on the model. When the effect of antioxidants was evaluated, cell death inducers were added 2 h post addition of antioxidants. At least three independent experiments were carried out for each cell death inducer/antioxidant pair.

Intracellular ROS measurements

For total intracellular ROS measurements, cells were incubated with 10 μ M CM-H₂DCFDA (excitation wavelength 492–495 nm, emission wavelength 517–527 nm) at 37°C under 5% CO₂. Cells were then analysed using the BD FACS Calibur system. Arbitrary units' values were calculated from geometric means (Geo Mean) (Cesen et al., 2013).

Mitochondrial ROS production

MitoSOX (excitation wavelength 510 nm, emission 580 nm), a fluorescent dye targeted primarily to mitochondria, was used for determination of mitochondrial ROS production. Live cells were stained with MitoSOX at a final concentration of 5 μ M for 30 min in a controlled atmosphere at 37°C. The BD FACS Calibur system was then used for measurements and analysis (Kaludercic et al., 2014; Maher et al., 2014). Arbitrary units' values were calculated from geometric means (Geo Mean).

Cell viability

Cell viability was determined by AnnexinV-PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)/propidium iodide (PI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) staining and BD FACS Calibur system was used for measurements and analysis (Cesen et al., 2013).

Caspase 3-like activity

Cultured cells were treated and whole-cell protein extracts were prepared in RIPA buffer as described (Ott et al., 2007; Spes et al., 2012). Caspase-3-like activity in the supernatant was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC (Bachem, Bubendorf, Switzerland) as described (Droga-Mazovec et al., 2008; Cesen et al., 2013). All experiments were performed in triplicates.

Acknowledgments: B.T.'s research was supported by the grants from Slovene Research Agency (P1-0140 and N1-0022), whereas P.V.'s research was supported by Belgian grants (Interuniversity Attraction Poles, IAP 7/32), Flemish grants (Research Foundation Flanders: FWO G.0C37.14N, FWO G.0E04.16N), Methusalem grant (BOF16/MET_V/007), a grant from the 'Foundation against Cancer' (FAF-F/2016/865), CRIG and VIB.

References

- Angeli, J.P.F., Shah, R., Pratt, D.A., and Conrad, M. (2017). Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 489–498.
- Batinic-Haberle, I., Rajic, Z., Tovmasyan, A., Reboucas, J.S., Ye, X., Leong, K.W., Dewhirst, M.W., Vujaskovic, Z., Benov, L.,

- and Spasojevic, I. (2011). Diverse functions of cationic Mn(III) N-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1035–1053.
- Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M.R., and Alexandrov, A.V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav.* 4, 108–122.
- Brown, G.C. and Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 12, 1–4.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.G., and Liu, Z.G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* 16, 55–65.
- Cauwels, A., Rogge, E., Janssen, B., and Brouckaert, P. (2010). Reactive oxygen species and small-conductance calcium-dependent potassium channels are key mediators of inflammation-induced hypotension and shock. *J. Mol. Med. (Berl.)* 88, 921–930.
- Cesen, M.H., Repnik, U., Turk, V., and Turk, B. (2013). Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes. *Cell Death Dis.* 4, e818.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., et al. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res.* 24, 105–121.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1, 112–119.
- Dikalov, S. and Harrison, D.G. (2006). Pharmacological compounds with antioxidant activity. In: *Antioxidants and Cardiovascular Disease*, M.G. Bourassa and J.-C. Tardif, eds. (New York, USA: Springer), p. 494.
- Dikalova, A.E., Kirilyuk, I.A., and Dikalov, S.I. (2015). Antihypertensive effect of mitochondria-targeted proxyl nitroxides. *Redox Biol.* 4, 355–362.
- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J. Biol. Chem.* 283, 19140–19150.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.
- Guo, X., Chen, S., Zhang, Z., Dobrovolsky, V.N., Dial, S.L., Guo, L., and Mei, N. (2015). Reactive oxygen species and c-Jun N-terminal kinases contribute to TEMPO-induced apoptosis in L5178Y cells. *Chem. Biol. Interact.* 235, 27–36.
- Jarvis, R.M., Gottert, J., Murphy, M.P., and Ledgerwood, E.C. (2007). Mitochondria-targeted antioxidants do not prevent tumour necrosis factor-induced necrosis of L929 cells. *Free Radic. Res.* 41, 1041–1046.
- Kaludercic, N., Deshwal, S., and Di Lisa, F. (2014). Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol.* 5, 285.
- Kaminsky, V.O. and Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid. Redox. Signal* 21, 86–102.
- Krishna, M.C., DeGraff, W., Tamura, S., Gonzalez, F.J., Samuni, A., Russo, A., and Mitchell, J.B. (1991). Mechanisms of hypoxic and aerobic cytotoxicity of mitomycin C in Chinese hamster V79 cells. *Cancer Res.* 51, 6622–6628.
- Krishna, M.C., Samuni, A., Taira, J., Goldstein, S., Mitchell, J.B., and Russo, A. (1996). Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of hemeproteins. Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.* 271, 26018–26025.
- Kruglov, A.G., Subbotina, K.B., and Saris, N.E. (2008). Redox-cycling compounds can cause the permeabilization of mitochondrial membranes by mechanisms other than ROS production. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 646–656.
- Kuksal, N., Chalker, J., and Mailloux, R.J. (2017). Progress in understanding the molecular oxygen paradox – function of mitochondrial reactive oxygen species in cell signaling. *Biol. Chem.* 398, 1209–1227.
- Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E., and Bartosz, G. (2008). The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 649, 7–14.
- Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J.M., Chandel, N.S., Vanden Hoek, T.L., and Schumacker, P.T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1925–1936.
- Luo, Z., Chen, Y., Chen, S., Welch, W.J., Andresen, B.T., Jose, P.A., and Wilcox, C.S. (2009). Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 157, 935–943.
- Maher, K., Jeric Kokelj, B., Butinar, M., Mikhaylov, G., Mancek-Keber, M., Stoka, V., Vasiljeva, O., Turk, B., Grigoryev, S.A., and Kopitar-Jerala, N. (2014). A role for stefin B (cystatin B) in inflammation and endotoxemia. *J. Biol. Chem.* 289, 31736–31750.
- Mariappan, N., Soorappan, R.N., Haque, M., Sriramula, S., and Francis, J. (2007). TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H2726–H2737.
- Moloney, J.N. and Cotter, T.G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80, 50–64.
- Morgan, M.J. and Liu, Z.G. (2010). Reactive oxygen species in TNF α -induced signaling and cell death. *Mol. Cells* 30, 1–12.
- Morgan, M.J. and Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21, 103–115.
- Murley, J.S., Kataoka, Y., Hallahan, D.E., Roberts, J.C., and Grdina, D.J. (2001). Activation of NF- κ B and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1426–1439.
- Nilsson, U.A., Olsson, L.I., Carlin, G., and Bylund-Fellenius, A.C. (1989). Inhibition of lipid peroxidation by spin labels. Relationships between structure and function. *J. Biol. Chem.* 264, 11131–11135.
- Offer, T., Russo, A., and Samuni, A. (2000). The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J.* 14, 1215–1223.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913–922.
- Rushworth, G.F. and Megson, I.L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion

- to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol. Ther.* **141**, 150–159.
- Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., and Choi, A.M. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal* **9**, 49–89.
- Salvemini, D., Muscoli, C., Riley, D.P., and Cuzzocrea, S. (2002). Superoxide dismutase mimetics. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **15**, 439–447.
- Samuni, A., Krishna, C.M., Riesz, P., Finkelstein, E., and Russo, A. (1988). A novel metal-free low molecular weight superoxide dismutase mimic. *J. Biol. Chem.* **263**, 17921–17924.
- Samuni, A.M., DeGraff, W., Krishna, M.C., and Mitchell, J.B. (2002). Nitroxides as antioxidants: Tempol protects against EO9 cytotoxicity. *Mol. Cell Biochem.* **234–235**, 327–333.
- Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748.
- Soule, B.P., Hyodo, F., Matsumoto, K., Simone, N.L., Cook, J.A., Krishna, M.C., and Mitchell, J.B. (2007). The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1632–1650.
- Spes, A., Sobotic, B., Turk, V., and Turk, B. (2012). Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines. *Biol. Chem.* **393**, 1417–1431.
- Stowe, D.F. and Camara, A.K. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid. Redox. Signal* **11**, 1373–1414.
- Tait, S.W., Oberst, A., Quarato, G., Milasta, S., Haller, M., Wang, R., Karvela, M., Ichim, G., Yatim, N., Albert, M.L., et al. (2013). Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep.* **5**, 878–885.
- Traber, M.G. and Stevens, J.F. (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1000–1013.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* **17**, 922–930.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714.
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Beyaert, R., Declercq, W., and Fiers, W. (1997). Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* **9**, 801–808.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998a). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **187**, 1477–1485.
- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998b). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* **188**, 919–930.
- Wilcox, C.S. (2010). Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol. Ther.* **126**, 119–145.
- Xu, J. (2005). Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **70**, 28.1.1–21.1.8.
- Zoccarato, F., Cavallini, L., Bortolami, S., and Alexandre, A. (2007). Succinate modulation of H₂O₂ release at NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. *Biochem. J.* **406**, 125–129.

Supplementary Material: The online version of this article offers supplementary material (<https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0317>).