

Ana Petelin

# **Vloga in pomen cisteinskih katepsinov pri različnih modelih programirane celične smrti**

**Doktorska disertacija**

## **Role and significance of cysteine cathepsins in different models of apoptosis**

**Doctoral Dissertation**

*Mentor:* prof. ddr. Boris Turk

*Somentor:* prof. dr. Vito Turk

Maj 2009

**MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA**  
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL

Ljubljana, Slovenija





## Kazalo

<b>Povzetek</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>Seznam kratic</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1 Apoptoza .....	1
1.2 Kaspaze .....	2
1.2.1 Razdelitev kaspaz .....	2
1.2.2 Struktura kaspaz .....	2
1.2.3 Aktivacija kaspaz .....	4
1.2.3.1 Zunanja (receptorska) pot .....	4
1.2.3.1.1 Aktivacija receptorja Fas/CD95 .....	4
1.2.3.1.2 Aktivacija receptorja TNF .....	5
1.2.3.2 Notranja (mitohondrijska) pot .....	6
1.2.4 Substrati kaspaz .....	7
1.2.5 Od kaspaz neodvisna celična smrt .....	7
1.3 Regulacija apoptoze .....	8
1.3.1 Proteini iz družine Bcl-2 .....	8
1.3.1.1 Delitev Bcl-2 proteinov .....	8
1.3.1.2 Način delovanja proteinov iz družine Bcl-2 .....	9
1.3.1.3 Mehanizmi sproščanja citokroma c iz mitohondrijev s pomočjo proteinov iz družine Bcl-2 .....	10
1.3.1.4 Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) pri poškodbi mitohondrijske membrane .....	11
1.3.2 Mitohondrijski proteini .....	11
1.3.3 Inhibitorji kaspaz .....	11
1.3.3.1 Inhibitorji apoptoze IAP .....	12
1.3.3.2 p35 .....	12
1.3.3.3 CrmA .....	12
1.3.3.4 FLIP .....	12
1.4 Lizosomi in apoptoza .....	12
1.4.1 Lizosomske cisteinske proteaze – katepsini .....	12
1.4.1.1 Sinteza, struktura in mehanizem delovanja katepsinov .....	12
1.4.1.2 Regulacija aktivnosti katepsinov .....	13
1.4.1.3 Fiziološka vloga katepsinov .....	13
1.4.1.4 Vloga katepsinov v apoptozi .....	14
1.4.2 Mehanizmi poškodbe lizosomske membrane .....	15
<b>2 Namen dela</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Materiali in metode</b> .....	<b>19</b>
3.1 Metode dela s celicami .....	19
3.1.1 Gojenje celic .....	19
3.1.2 Tripsinizacija in precepljanje celic .....	19
3.1.3 Zamrzovanje celic .....	19
3.1.4 Odmrzovanje celic .....	19

3.2 Sprožitev apoptoze z destabilizacijo lizosomov v človeški celični liniji HaCaT z lizosomotropno snovjo L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe) .....	19
3.2.1 Določitev optimalne koncentracije LeuLeuOMe .....	19
3.2.2 Sprožitev apoptoze z LeuLeuOMe .....	20
3.2.3 Določanje deleža apoptotskih celic z metodo pretočne citometrije .....	20
3.2.4 Merjenje aktivnosti kaspaze-3 .....	20
3.2.5 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji .....	20
3.2.6 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi .....	20
3.2.7 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom RIPA .....	21
3.2.8 Priprava citosolnega lizata z digitoninom .....	21
3.2.9 Določanje koncentracije proteinov v vzorcu .....	21
3.2.10 NaDS poliakrilamidna elektroforeza (NaDS PAGE) .....	21
3.2.11 Prenos Western .....	21
3.2.12 Imunodetekcija .....	22
3.3 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali L .....	22
3.3.1 Priprava primarnih mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa .....	22
3.3.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX .....	22
3.3.3 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi .....	23
3.3.4 Ocenitev znotrajcelične oksidacije oziroma spremljanje nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti .....	23
<b>4 Rezultati .....</b>	<b>25</b>
4.1 Sprožitev apoptoze z lizosomotropno snovjo L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe) v človeški celični liniji HaCaT .....	25
4.1.1 Sprožitev apoptoze v človeški celični liniji HaCaT .....	25
4.1.1.1 Določitev optimalne koncentracije LeuLeuOMe .....	25
4.1.1.2 Delež apoptotskih celic in DEVD-azna aktivnost po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe .....	25
4.1.1.3 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi in imunodetekcija katepsina L .....	26
4.1.1.4 Imunodetekcija proapoptotske molekule Bid in določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji .....	27
4.1.1.5 Imunodetekcija antiapoptotskih proteinov Bcl-xL, Mcl-1 in Bcl-2 .....	28
4.1.1.6 Imunodetekcija citokroma c in cepljene oblike proteina PARP .....	28
4.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L .....	29
4.2.1 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa .....	29
4.2.1.1 Določitev optimalne koncentracije TNF- $\alpha$ v prisotnosti CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa .....	29
4.2.1.2 Delež apoptotskih celic in imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa v prisotnosti inhibitorjev, z-VAD-fmk ali E-64d .....	30
4.2.1.3 Delež apoptotskih celic .....	31
4.2.1.4 Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid .....	31
4.2.1.5 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji in lizosomi .....	32
4.2.1.6 Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX .....	33
4.2.1.7 Vpliv butiliranega hidroksianizola (BHA), odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti, na delež apoptotskih celic, delež celic s poškodovanimi mitohondriji in delež celic s poškodovanimi lizosomi .....	33
4.2.1.8 Vpliv TEMPOLA, odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti, in DESFEROKSAMINA, kelatorja železovih ionov, na odstotek celic s poškodovanimi lizosomi .....	38
4.2.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L .....	39
4.2.2.1 Delež apoptotskih celic .....	39
4.2.2.2 Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid .....	40
4.2.2.3 Določanje deleža celic s poškodovanimi mitohondriji in nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L .....	41

4.2.2.4 Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L.....	42
4.2.2.5 Imunodetekcija molekule Bid .....	42
<b>5 Razprava .....</b>	<b>45</b>
5.1 Sprožitev apoptoze z lizosomotropno snovjo L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe) v človeški celični liniji HaCaT.....	45
5.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L .....	49
<b>6 Zaključki .....</b>	<b>53</b>
<b>7 Zahvale .....</b>	<b>55</b>
<b>8 Literatura in viri.....</b>	<b>57</b>
<b>Kazalo slik .....</b>	<b>67</b>
<b>Kazalo tabel.....</b>	<b>71</b>
<b>Priloge .....</b>	<b>73</b>



## Povzetek

Programirana celična smrt je aktiven proces, pri katerem večcelični organizmi odstranijo odvečne ali škodljive celice, kar je potrebno za normalen razvoj organizma. Obstaja več oblik programirane celične smrti, med katerimi je najbolj raziskana apoptoza. Značilne morfološke in biokemijske lastnosti umirajoče celice so posledica aktivnosti cisteinskih proteaz iz družine kaspaz. V splošnem obstajata dve glavni poti sprožitve kaspazne kaskade: zunanja pot preko receptorjev smrti in notranja oz. mitohondrijska pot. Za zunanjo pot je značilno, da proapoptotski dražljaj iz zunanosti celice sproži oligomerizacijo membranskih receptorjev smrti (družina TNF). Posledica oligomerizacije receptorjev je tvorba kompleksa DISC na citosolni strani celične membrane. Nanj se veže sprožitvena prokaspaza-8 ali -10, ki oligomerizira in se tako aktivira. Za notranjo pot je značilno, da proapoptotski signali znotraj celice povzročijo, da se citokrom c sprosti iz mitohondrijev v citosol, kjer skupaj z Apaf-1 in ATP tvori kompleks apoptosom, na katerega se nato veže še prokaspaza-9. Zunanjo in notranjo pot apoptoze povezuje proapoptotski protein Bid, iz družine Bcl-2, ki ga lahko cepijo kaspaza-8, kalpaini, grancim B in lizosomske proteaze.

Vedno več je dokazov, ki poleg kaspaz potrjujejo tudi vlogo cisteinskih proteaz oziroma katepsinov v procesu apoptoze. Do destabilizacije lizosomskih membran *in vivo* prihaja predvsem med staranjem in pri različnih bolezenskih stanjih, kot so nevrodegenerativne bolezni in ishemija. Zmanjšanje stabilnosti lizosomskih membran *in vitro* pa lahko povzročijo sfingozin, oksidativni stres, aktivacija receptorjev smrti ter lizosomotropne snovi, kot je L-levcil-L-levcil-metilni ester (LeuLeuOMe). Kljub temu, da je primarna funkcija lizosomskih proteaz razgradnja proteinov v lizosomih, so katepsini aktivni tudi zunaj njih. Ko so enkrat v citosolu, lahko sprožijo apoptozo preko notranje poti. Destabilizacija lizosomov *in vitro* in *in vivo* je povzročila cepitev Bida s katepsini, čemur so sledili sproščanje citokroma c in aktivacija kaspaze-3. Vendar pa cepitev Bida s katepsini ni nujno edina pot sprožitve apoptoze, saj lahko katepsini cepijo ali razgrajujejo tudi antiapoptotske proteine iz družine Bcl-2. V citosolu lahko cisteinski proteazi katepsin B in L ter aspartatna proteaza katepsin D sprožijo permeabilizacijo zunanje mitohondrijske membrane, čemur sledi od kaspaz-odvisna ali od kaspaz-neodvisna programirana celična smrt.

Naš prvi namen dela je bil natančneje raziskati mehanizem sprožitve apoptoze z neposredno destabilizacijo lizosomov z lizosomotropno kemikalijo LeuLeuOMe na človeški celični liniji HaCaT, ter pojasniti vlogo in pomen katepsinov na tem modelu celične smrti. Pri sprožitvi apoptoze z neposredno destabilizacijo lizosomov smo pokazali, da pride do vrste morfoloških in biokemijskih sprememb značilnih za apoptozo, kot so izpostavitve fosfatidilserina na zunanjo stran celične membrane, povečana aktivnost kaspaze-3, poškodba mitohondrijske membrane ter cepitev molekule PARP. Pokazali smo tudi, da se pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe lizosomi poškodujejo pred mitohondriji. Cisteinski katepsini, ki se sprostijo iz lizosoma v citosol, pa lahko cepijo Bid ali razgradijo antiapoptotski protein Bcl-xL. Inhibitor lizosomskih cisteinskih proteaz E-64d je cepitev Bida in razgradnjo proteina Bcl-xL preprečil, pankaspazni inhibitor z-VAD-fmk pa na ta dva procesa ni imel vpliva.

Tudi po aktivaciji receptorjev smrti prihaja do destabilizacije lizosomske membrane in posledičnega prehajanja katepsinov v citosol. Natančni mehanizmi sprožitve celične smrti, zaradi destabilizacije lizosomskih membran preko receptorjev smrti, še vedno niso popolnoma pojasnjeni. Nekateri avtorji trdijo, da je destabilizacija lizosomov zgodnji dogodek v apoptozi, temu pa sledi destabilizacija mitohondrijev in aktivacija kaspaz. Naše zadnje ugotovitve na mišjih primarnih dermalnih fibroblastih pa kažejo, da je po aktivaciji receptorja Fas destabilizacija lizosomov lahko tudi sekundarni dogodek oziroma do nje pride po poškodbi mitohondrijev. Zato je bil naš naslednji namen dela natančneje raziskati mehanizem sprožitve destabilizacije lizosomske membrane pri apoptozi sproženi s fiziološkim sprožilcem apoptoze TNF- $\alpha$  na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L. Ugotovili smo, da je pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$ /CHX poškodba lizosomske membrane sekundarni dogodek, saj je prišlo najprej do poškodbe mitohondrijske membrane, temu pa je sledila poškodba lizosomov. Ugotovili smo tudi, da so za poškodbo lizosomske membrane odgovorne reaktivne kisikove zvrsti, ki nastanejo po poškodbi mitohondrijske membrane. To smo potrdili z uporabo odstranjevalcev reaktivnih kisikovih zvrsti, kot sta butiliran hidroksianizol in TEMPOL, ter z uporabo kelatorja železovih ionov desferoksamina. V nadaljevanju smo ugotovili, da katepsina B in L na našem celičnem modelu najverjetneje predstavljata le ojačitveno zanko med lizosomi in mitohondriji. In

nenazadnje smo tudi pokazali, da je protein Bid substrat za katepsine, saj smo zaznali manj cepljene oblike v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L v primerjavi s celicami divjega tipa.

## Abstract

Programmed cell death is a highly organized process by which multicellular organisms eliminate damaged, superfluous and potentially harmful cells. Apoptosis is the most studied form of programmed cell death. It is characterized by typical morphological and biochemical changes which are a consequence of activation of cysteine proteases, caspases. Apoptosis is mediated through two major pathways, the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway. In the extrinsic pathway, the ligation of death ligands with their receptors results in formation of the death-inducing signaling complex (DISC), in which caspases -8 or -10 are activated. Activation of the intrinsic pathway is a consequence of intracellular stress, resulting in cytochrome c release from the mitochondria into the cytosol, leading to the formation of the apoptosome complex and subsequent activation of effector caspases. In certain cells, signals from the extrinsic pathway are amplified by recruitment of the intrinsic pathway. This is achieved by caspase-8 mediated cleavage of the protein Bid leading to mitochondrial permeabilization. Bid can also be cleaved by calpains, granzyme B, and lysosomal proteases.

Apoptosis can be mediated by mechanisms other than traditional caspase-mediated cleavage cascade. There is increasing evidence that alternative proteolytic enzymes such as lysosomal proteases (cathepsins) can initiate or propagate proapoptotic signals. *In vivo*, lysosomal membrane permeabilization occurs during aging and in different neurodegenerative diseases. *In vitro*, lysosomal membrane permeabilization can be induced by sphingosine, oxidative stress, activation of death receptors, as well as by lysosomotropic agents such as L-leucyl-L-leucine methyl ester (LeuLeuOMe). The main function of lysosomal proteases is to recycle proteins within lysosomes, but they can be also active when released into the cytosol. Once in the cytosol they activate proapoptotic molecules such as Bid or inactivate antiapoptotic Bcl-2 proteins, thereby, leading to mitochondrial pathway. However, they have been also suggested to trigger caspase-independent cell death.

The aim of our work was to understand the molecular mechanisms by which lysosomal proteases induce apoptosis triggered by the lysosomotropic agent LeuLeuOMe and to investigate the role of cathepsins in this model of apoptosis. The destabilization of lysosomes by LeuLeuOMe in HaCaT cell line caused morphological and biochemical changes typical for apoptosis, such as phosphatidylserine externalization, caspase activation, mitochondrial damage, and PARP cleavage. We showed that the addition of LeuLeuOMe resulted in lysosomal destabilization prior to mitochondrial damage. Apoptosis induced by LeuLeuOMe resulted in the cleavage of Bid to its truncated form. The latter could be prevented by E-64d, a broad spectrum inhibitor of papain-like lysosomal cysteine proteases, but not by the pancaspase inhibitor z-VAD-fmk. Moreover, we also showed that cathepsins degrade the antiapoptotic protein Bcl-xL. This degradation was prevented by E-64d, but not by z-VAD-fmk. These results suggest that apoptosis triggered by LeuLeuOMe is caspase-dependent.

It was reported that lysosomal destabilization was also involved in the extrinsic pathway of apoptosis. The exact mechanisms by which lysosomal destabilization lead to cell death are still not well understood. Some authors suggested that lysosomal destabilization is an early event in apoptosis, thus preceding mitochondrial destabilization. On the other side, we recently showed that in Fas-induced apoptosis, lysosomes were destabilized after the mitochondria.

In order to address this question, TNF- $\alpha$  induced apoptosis was investigated in wild-type and cathepsin B and cathepsin L-deficient primary mouse embryonic fibroblasts. In mouse embryonic primary fibroblasts, we showed that in TNF- $\alpha$  induced apoptosis, destabilization of mitochondria precede destabilization of lysosomes. Moreover, the reactive oxygen species produced by mitochondria, were responsible for destabilization of lysosomes. This effect was almost completely prevented by reactive oxygen species scavengers, butylated hydroxyanisole and TEMPOL, and a potent iron chelator desferrioxamine. We further confirmed that cathepsins B and/or L contribute to TNF- $\alpha$  signalling downstream of lysosomal destabilization. In addition, we showed that Bid cleavage was significantly reduced in cathepsin B and cathepsin L deficient fibroblasts, thus proving that Bid is a critical substrate for cathepsins in our cellular model.



## Seznam kratic

AAD	=	7-amino-aktinomycin D
Ac-DEVD-AFC	=	N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometil kumarin
aneksin V-PE	=	aneksin V-pikoeitrin
ANT	=	ANT translokator; adenine nucleotide translocator
AO	=	akridin oranž
Apaf	=	aktivacijski faktor 1 apoptozne proteaze; apoptotic protease-activating factor
APS	=	amonijev persulfat
B <sup>-/-</sup>	=	celice z izbitim genom za katepsin B
Bak	=	antagonist Bcl-2 in ubijalec, Bcl-2 antagonist/killer
Bax	=	z Bcl-2 povezan protein x; Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	=	protein 2 iz limfoma celic B; B-cell lymphoma 2
BH	=	regije, homologne Bcl-2, Bcl-2 homology regions
BHA	=	odstranjevalec reaktivnih kisikovih zvrsti oziroma antioksidant; butiliran hidroksianizol; butylated hydroxyanisole
Bid	=	protein smrti, ki reagira z domeno BH-3; BH-3 interacting domain death protein
Bim	=	posrednik celične smrti, ki reagira z Bcl-2; Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIR	=	bakulovirusno zaporedje IAP, baculovirus IAP repeat
CARD	=	domena, ki rekrutira kaspaze; caspase recruitment domain
CED	=	protein smrti pri Caenorhabditis elegans; Caenorhabditis elegans death
CHAPS	=	3-[(kloraminopropil)dimetilamonio]-2-hidroksi-1-propan-cikloheksimid
CHX	=	
CrmA	=	A modifikator odgovora na citokine; cytokine response modifier A
DcR	=	vabni receptor; lažni receptor; decoy receptor
DD	=	domena smrti; death domain
DED	=	efektorska domena smrti; death effector domain
DFO	=	desferoksamin; kelator železovih ionov; desferrioxamine
DIABLO	=	protein z nizkim pI, ki neposredno veže IAP; direct IAP binding protein with low pI
DISC	=	signalni kompleks, ki sproži smrt; death inducing signaling complex
DMEM	=	po Dulbeccu spremenjen medij Eagle; Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	=	dimetil sulfoksid; dimethyl sulfoxide
DR	=	receptor smrti; death receptor
D.T.	=	celice divjega tipa
DTT	=	ditiotritol
E-64d	=	L-trans-epoksisukcinil(OEt)-Leu-3-metilbutilamid
ECL	=	povečana kemoluminiscenca; enhanced chemoluminescence
EDTA	=	etilendiamin tetraacetat
EGTA	=	etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetraacetat
FADD	=	na Fas vezan protein z domeno smrti; Fas-associated death domain protein
FBS	=	fetalni goveji serum; fetal bovine serum
FLICE	=	ICE, podoben FADD; Fadd-like ICE
FLIP	=	proteini, ki inhibirajo FLICE; FLICE-inhibitory proteins
IAP	=	inhibitor apoptoze; inhibitors of apoptosis
ICE	=	encim, ki cepi interleukin 1β; interleukin-1β converting enzyme
JNK	=	C-Jun N-terminalna kinaza; c-Jun N-terminal kinase
L <sup>-/-</sup>	=	celice z izbitim genom za katepsin L
LeuLeuOMe	=	L-Levcil-L-levcin metilni ester; L-Leucyl-L-Leucine methyl ester
MSDH	=	O-metil-serin dodecilamid hidroklorid; O-methyl-serine dodecylamide hydrochloride

mPTP	=	mitohondrijska prevodna pora; mitochondrial permeability transition pore
NaDS	=	natrijev dodecil sulfat
NF- $\kappa$ B	=	jedrni dejavnik $\kappa$ B; <u>n</u> uclear <u>f</u> actor- <u><math>\kappa</math>B</u>
NP40	=	nonilfenilpolietilen glikol; <u>n</u> onylphenylpolyethylene glycol
PAGE	=	poliakrilamidna gelska elektroforeza; <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis
PARP	=	poliADP-riboza polimeraza; ( <u>p</u> oly) <u>A</u> DP- <u>r</u> ibose <u>p</u> olymerase
PBS	=	s fosfatom zapufrana raztopina soli; <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline
PLAD	=	religand assembly domain
RAIDD	=	RIP-associated ICH/Ced3 homologous DD protein
RIP	=	protein, ki sodeluje z receptorjem; <u>r</u> eceptor <u>i</u> nteracting protein
ROS	=	reaktivne kisikove zvrsti; <u>r</u> eactive <u>o</u> xxygen <u>s</u> pecies
SCAVENGER	=	odstranjevalec reaktivnih kisikovih zvrsti
SMAC	=	drugi mitohondrijski aktivator kaspaz; <u>s</u> econd <u>m</u> itochondria-derived <u>a</u> ctivator of caspase
SODD	=	silencer of death domain
tBid	=	skrajšana oblika molekule Bid; <u>t</u> runcated <u>B</u> id
TEMED	=	N, N, N', N'-tetrametilendiamin
TNF	=	dejavnik tumorske nekroze; <u>t</u> umor necrosis <u>f</u> actor
TNF-R1	=	receptor tipa 1 za TNF; <u>t</u> umor necrosis <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor <u>1</u>
TRADD	=	na receptor TNF vezan protein, ki vsebuje domeno DD; <u>T</u> NF <u>r</u> eceptor- <u>a</u> ssoiated <u>d</u> eath <u>d</u> omain protein
TRAF-2	=	TNF-receptor-associated factor-2
TRAIL	=	TNF podoben ligand, ki sproži apoptozo; <u>T</u> NF- <u>r</u> elated <u>a</u> poptosis- <u>i</u> nducing <u>l</u> igand
TRIS	=	tris (hidroksimetil) aminometan
triton X-100	=	polietilen glikol-mono-[p-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)-fenil] eter
VDAC	=	napetostno občutljiv anionski kanal; <u>v</u> oltage- <u>d</u> eependent <u>a</u> nion <u>c</u> hannel
XIAP	=	na kromosom X vezan inhibitor apoptoze; <u>X</u> -linked <u>i</u> nhibitors of <u>a</u> poptosis
Z-VAD-fmk	=	z-Val-Ala-Asp-fmk; N-benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon; N-benzoylcarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoro-methylketone

# 1 Uvod

## 1.1 Apoptoza

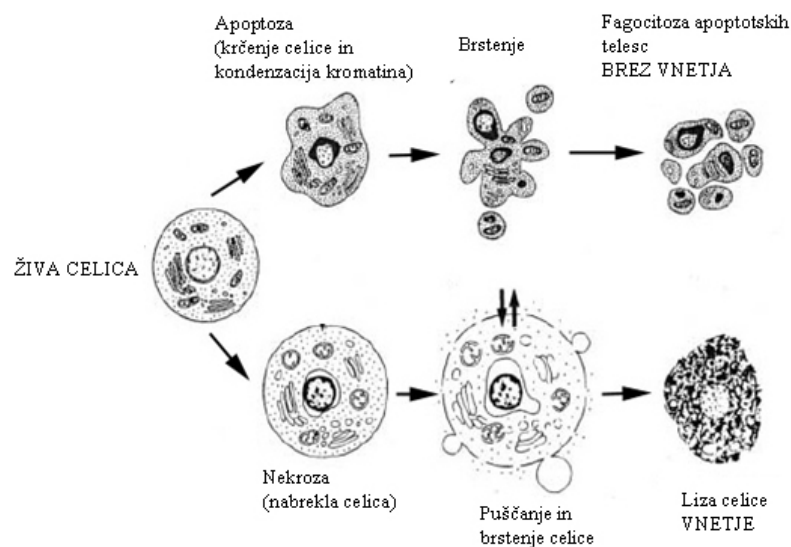
Število celic v tkivu uravnava dva osnovna biološka procesa – celična delitev in celična smrt. Poznani sta dve obliki celične smrti – apoptoza in nekroza. Apoptozo kot obliko celične smrti, je glede na značilne spremembe celic prvi opisal John Kerr (Kerr et al., 1972).

Apoptoza je morfološko in biokemijsko specifična oblika celične smrti in predstavlja pomemben proces v razvoju in homeostazi večceličnih organizmov (Jin and El-Deiry, 2005). Za normalno delovanje organizma je apoptoza nujno potrebna, saj se z njo odstranjujejo poškodovane, odvečne in potencialno nevarne celice. Vsaka nepravilnost pri regulaciji apoptoze lahko privede do različnih razvojnih motenj in bolezni kot so rak, avtoimunske bolezni in nevrodegeneracija (Thompson, 1995).

Apoptoza je genetsko kontrolirana oblika celične smrti in jo sprožajo različni dražljaji iz okolice ali znotraj celice (vezava membranskih receptorjev, poškodba DNA, pomanjkanje rastnih faktorjev, obsevanje, zdravljenje s citotoksičnimi zdravili in drugi) (Earnshaw et al., 1999).

Med apoptozo se celica morfološko in biokemijsko spremeni (Salvesen and Dixit, 1997). Pride do krčenja celice, razkroja citoskeleta, kondenzacije jedra in citoplazme, brstenja celične membrane, fragmentacije DNA in izpostavitve fosfatidilserina in nekaterih glikoproteinov na zunanjo stran celične membrane (Slika 1) (Steller, 1995; Thornberry and Lazebnik, 1998). To so signali, ki označijo apoptotske celice tako, da jih prepoznajo sosednje celice ali makrofagi in jih požrejo v procesu fagocitoze. S tem preprečijo razlitje celične vsebine v zunajcelični prostor ter posledično vnetje (Thornberry and Lazebnik, 1998). Najpomembnejša biokemijska sprememba apoptotskih celic je aktivacija družine visoko specifičnih proteolitskih encimov iz skupine cisteinskih proteinaz, kaspaz (Salvesen and Dixit, 1997).

V nasprotju z apoptozo, ki je genetsko nadzorovana oblika celične smrti, predstavlja nekroza nenadno obliko celične smrti, ki se sproži kot odziv na ekstremne fiziološke razmere. Celična vsebina se pri nekrozi sprosti v medcelični prostor, kar velikokrat povzroča vnetje (Vakkila and Lotze, 2004).



Slika 1: Značilnosti apoptotične in nekrotične celične smrti. Apoptotska celica se skrči, jedro se zgosti. Tako odmrla celica ne izzove vnetne reakcije in jo naglo fagocitirajo in razgradijo sosednje celice predvsem makrofagi. Pri nekrozi pa celica nabrekne, počni in spusti vsebino v okoliško tkivo kar privede do vnetja (povzeto po Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).

## 1.2 Kaspaze

Kaspaze (*caspases – cysteine-dependent aspartate specific proteases*) so cisteinske proteaze, ki jih najdemo predvsem v citosolu.

Kaspaze sodijo v klan cisteinskih proteaz CD, družino C14 (Rawlings and Barret, 1993). Skupno vsem proteazam v tem klanu je, da cepijo peptidno vez za aspartatom (Thornberry et al., 1997). Njihova aktivacija tako ne pripelje do vsesplošne razgradnje proteinov. Za aspartatom cepi še cisteinska proteaza legumain in grancim B, ki pa je serinska proteinaza (Thornberry et al., 1997; Chen et al., 1998).

Prva odkrita kaspaza pri človeku je bila kaspaza-1, ki ima ključno vlogo pri procesiranju interleukina 1- $\beta$  in so jo zato tudi poimenovali ICE (Thornberry et al., 1992). Zatem so sledila odkritja še drugih homologov in tako je danes pri sesalcih poznanih 14 kaspaz (Strasser et al., 2000; Stennicke and Salvesen, 2000).

### 1.2.1 Razdelitev kaspaz

Kaspaze lahko razdelimo na dve skupini in sicer glede na proces v katerem sodelujejo in glede na njihovo substratno specifičnost.

Glede na proces v katerem sodelujejo razdelimo kaspaze na proapoptotske ali CED-3 skupino (sodelujejo v procesu apoptoze) in na provnetne ali ICE skupino (sodelujejo pri aktivaciji citokinov) (Tabela 1). CED-3 je protein ki je pri *Caenorhabditis elegans* udeležen v uravnavanju celične smrti in je funkcionalno kaspaza. *C. elegans* je majhen črv, pri katerem se med somatskim razvojem tvori natanko 1090 celic, od tega jih gre 131 v apoptozo. Ključna spoznanja o molekularnih mehanizmih celične smrti izhajajo prav iz genetskih raziskav na *C. elegans*. V primeru mutacije gena *ced 3* se apoptoza ne pojavi in vseh 1090 celic preživi. Glede na vlogo, ki jo imajo proapoptotske kaspaze pri apoptozi, jih razdelimo na dve podskupini, sprožitvene in izvršitvene (Earnshaw et al., 1999). Sprožitvene kaspaze se v procesu apoptoze aktivirajo prve. Njihova naloga je cepitev in s tem aktivacija izvršitvenih kaspaz, ki nato cepijo svoje substrate v celici kar pripelje do značilne apoptotske morfologije celice.

Tabela 1: Razdelitev kaspaz glede na proces v katerem sodelujejo. Kaspaze razdelimo na provnetne in proapoptotske. Proapoptotske pa razdelimo še v dve podskupini, sprožitvene in izvršitvene.

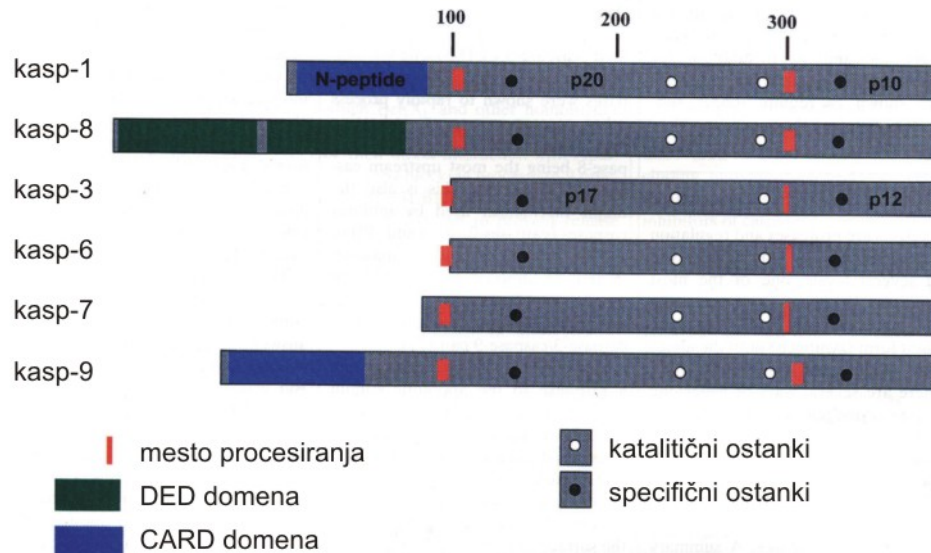
Provnetne	Proapoptotske	
	Sprožitvene	Izvršitvene
Kaspaza-1	Kaspaza-2	
Kaspaza-4	Kaspaza-8	
Kaspaza-5	Kaspaza-9	
Kaspaza-11	Kaspaza-10	
Kaspaza-12		Kaspaza-3
Kaspaza-13		Kaspaza-6
Kaspaza-14		Kaspaza-7

Kaspaze sodijo med zelo selektivne proteaze. Prepoznajo relativno kratko zaporedje aminokislin, ki jih označimo s P1, P2, P3 in P4, pri čemer je P4 na N-koncu, P1 pa na C-koncu peptidne verige. Na P1 je vedno aspartat, na P2 različne aminokislino, na P3 najpogosteje glutamat, aminokislina na mestu P4 pa določa substratno specifičnost različnih kaspaz (Thornberry et al., 1997). Čeprav je dokazano, da je na P1 vedno aspartat, so nekatere študije pokazale, da lahko nekatere kaspaze cepijo tudi za Glu (Srinivasula et al., 2001). Glede na aminokislino na položaju P4 delimo kaspaze v tri skupine. V skupino I, ki ustreza skupini ICE, sodijo kaspaze z afiniteto do hidrofobnih aminokislin na P4. Kaspaze v skupini II imajo afiniteto do aspartata na P4, v skupini III pa do razvejanih aminokislin. Kaspaze skupine II in III sodelujejo pri apoptozi in skupaj tvorijo skupino CED 3. Študije s sintetičnimi substrati so pokazale, da v mestih S1-S3 pri kaspazah ni večjih razlik (Nicholson, 1999; Timmer and Salvesen, 2007).

### 1.2.2 Struktura kaspaz

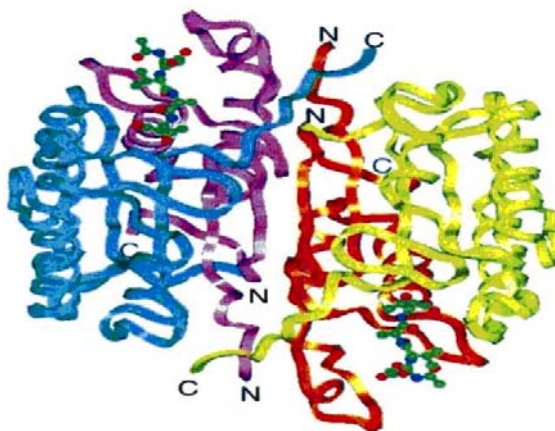
V citosolu se kaspaze sintetizirajo v obliki prekurzorjev (neaktivni zimogen, proencim). Sprožitvene kaspaze se sintetizirajo kot monomeri, izvršitvene pa kot dimeri (Boatright et al., 2003). Proencim ali zimogen je sestavljen iz NH<sub>2</sub>-terminalne prodomene, ki je vezana na 17-20 kDa veliko podenoto, ta pa je

preko povezovalnega peptida vezana na malo podenoto velikosti 9-12 kDa (Earnshaw et al., 1999). Nekatere kaspaze povezovalne regije nimajo. Mala in velika podenota sta relativno ohranjeni, medtem ko je NH<sub>2</sub>-terminalna prodomena različnih velikosti. Splošno velja, da imajo sprožitvene kaspaze dolge prodomene (pri kaspazi-8 in -10 celo do 200 aminokislin), izvršitvene pa kratke (pri kaspazi-3 samo 20 aminokislin) (Salvesen and Dixit, 1997; Thornberry et al., 1997; Nicholson, 1999, Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Dolge prodomene sprožitvenih kaspaz vsebujejo efektorsko domeno smrti (DED) ali domeno, ki rekrutira kaspaze (CARD), ki sodelujejo v povezavah med proteini in so pomembne za aktivacijo (Slika 2).



Slika 2: *Shematska predstavitev kaspaz*. Proencim je sestavljen iz NH<sub>2</sub> terminalne prodomene (N-peptida), ki je vezana na veliko podenoto (p20; p17), ta se pa veže preko povezovalnega peptida na malo podenoto (p10; p12). Sprožitvene kaspaze imajo dolge prodomene, ki vsebujejo CARD ali DED domene, izvršitvene pa vsebujejo kratke prodomene (povzeto po Turk, 1999).

Po proteolitični cepitvi prokaspaze se velika in majhna podenota ločita in tvorita heterotetramerni kompleks (Nicholson and Thornberry, 1997; Earnshaw et al., 1999). Aminokislina Asp na mestu 297 je najpomembnejše cepitveno mesto pri večini kaspaz. Prodomena se odcepi, ni pa nujno (Salvesen and Dixit, 1997; Nicholson and Thornberry, 1997). Aktivno mesto kaspaz predstavlja katalitska diada His-Cys, ki se nahaja v velikih podenotah, majhni podenoti pa prispevata k tvorbi regije, ki veže substrat (Riedl et al., 2001). Kristalografske študije so pokazale, da je aktivna kaspaza tetramer, sestavljena iz dveh heterodimerov (dve mali in dve veliki podenoti) (Slika 3) (povzeto po Chowdhury et al., 2008). Vsak heterodimer vsebuje aktivno mesto (Nicholson and Thornberry, 1997; Earnshaw et al., 1999).



Slika 3: *Struktura aktivne kaspaze-3 v kompleksu z inhibitorjem*. Vidni sta dve veliki (modra in rumena) in dve majhni (vijola in oranžna) podenoti. Vidno je tudi aktivno mesto (kroglice) (povzeto po Fesik, 2000).

### 1.2.3 Aktivacija kaspaz

Kaspaze ostanejo v latentni obliki vse dokler ne pride do apoptotskega dražljaja. Do aktivacije kaspaz pride po dveh signalnih poteh in sicer po zunanji (receptorski) poti in notranji (mitohondrijski) poti.

Za aktivacijo sprožitvenih kaspaz je potrebna dimerizacija oziroma oligomerizacija (Chang et al., 2003; Donepudi et al., 2003). Način aktivacije prokaspaze-8 poskuša razložiti t.i. »model približanja« (angl. induced proximity model) – povezava med adapterskimi beljakovinami in prokaspazo-8 omogoči, da se posamezne prokaspaze-8 približajo druga drugi, kar omogoči njihovo transaktivacijo (Askenazi and Dixit, 1998; Boatright et al., 2003; Donepudi et al., 2003). Podoben mehanizem aktivacije velja tudi pri prokaspazi-9 (Renatus et al., 2001; Boatright and Salvesen, 2003).

Izvršitvene kaspaze pa se aktivirajo s cepitvijo male in velike podenote, ki jo izvršijo sprožitvene kaspaze (Boatright et al., 2003) ali druge proteaze (serinska proteaza grancim B) (Darmon et al., 1995; Quan et al., 1996).

#### 1.2.3.1 Zunanja (receptorska) pot

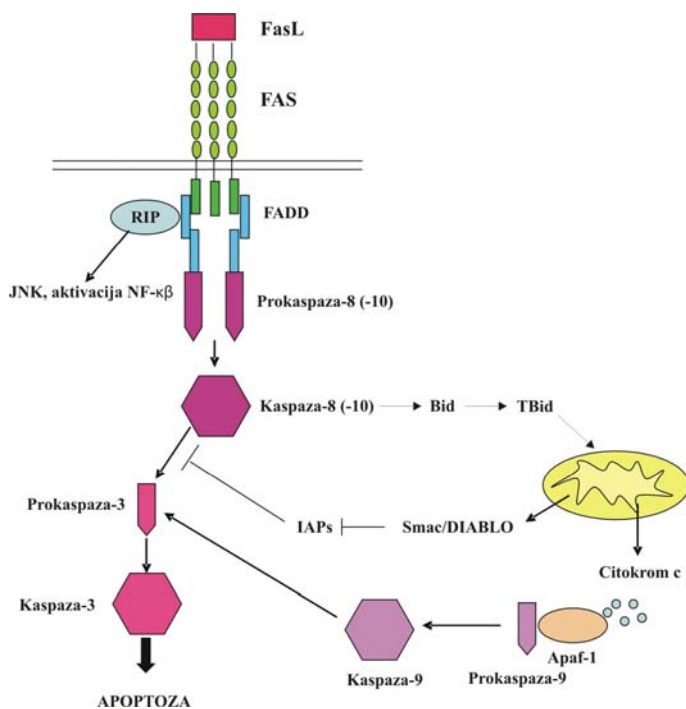
Apoptozo lahko sproži vezava ligandov na receptorje smrti. To je skupina receptorjev znotraj družine receptorjev TNF (Kaufmann and Hengartner, 2001). Najbolj raziskani so, dejavnik tumorske nekroze-1 (nanj se veže TNF $\alpha$ ), Fas/CD95 (nanj se veže ligand FasL), ter DR4 in DR5 (nanju se veže TRAIL) (Nagata, 1997; Shulze-Osthoff et al., 1998; Ashkenazi and Dixit, 1999; French and Tschopp, 2003).

Receptorji smrti imajo v citoplazemski regiji zaporedje, imenovano domena smrti (DD). Gre za ohranjeno zaporedje 80 aminokislinskih ostankov (Philchenkov, 2004). Receptorji vsebujejo tudi domene bogate s cisteini, ki so pomembne za vezavo z ligandom (Jin and El-Deiry, 2005). Poznamo tudi topni Fas vabni receptor (decoy receptor) DcR3 in tri TRAIL receptorje, DcR1, DcR2 in OPG. Ti receptorji nimajo domene smrti in vezava ligandov ne sproži kaspazne kaskade (Askenazi and Dixit, 1999). Za vezavo liganda se morajo receptorji preko specifičnih funkcionalnih regij, ki se nahajajo v zunajcelični regiji, povezati in tvoriti kompleks PLAD. Interakcija med ligandom in zunajcelično regijo receptorja preko domene smrti omogoči oligomerizacijo in/ali konformacijsko spremembo receptorja, ki omogoči prenos signala na adaptorske proteine FADD, RIP, RAIDD ter TRADD. Sprožitvene molekule (prokaspaza-8 in prokaspaza-10) se ob vezavi na izvršitvene molekule aktivirajo in sprožijo kaspazno kaskado (Walczak and Krammer, 2000). Kompleks receptorja in adaptorskega proteina imenujemo DISC (Ashkenazi and Dixit, 1998).

##### 1.2.3.1.1 Aktivacija receptorja Fas/CD95

Najbolj raziskan receptor smrti je Fas/CD95. Vezava liganda FasL na receptor FAS povzroči njegovo trimerizacijo in združevanje domen smrti na znotrajcelični strani. Preko domen smrti se na receptor veže adaptor FADD. Molekula FADD vsebuje tudi domene DED preko katerih se aktivira kaspaza-8 (Slika 4) (Chinnaiyan et al., 1995). V celicah tipa I je aktivacija kaspaze-8 preko kompleksa DISC zadostna za neposredno aktivacijo kaspaze-3. V celicah tipa II pa kaspaza-8 najprej cepi molekulo Bid in tako posredno povzroči apoptozo preko mitohondrijske poti (Li et al., 1998). Končni rezultati v obeh tipih celic je razpad celice na apoptotska telesa in njihova fagocitoza.

Signaliziranje in sprožitev apoptoze preko receptorja TRAIL je zelo podobno receptorju FAS (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).

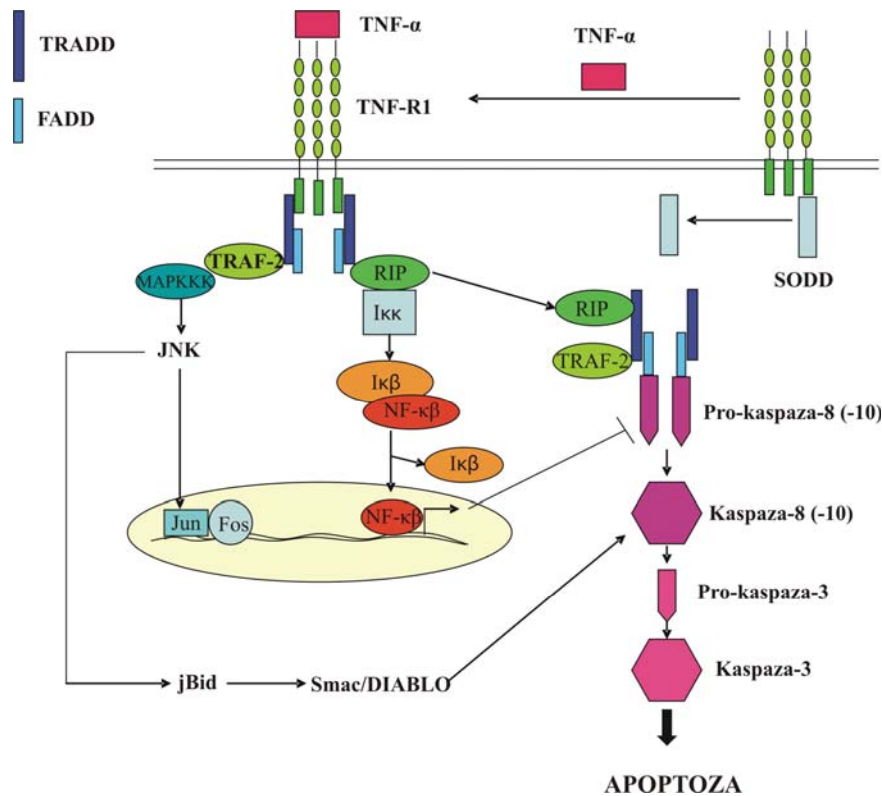


Slika 4: Pot apoptoze sprožena preko aktivacije receptorja FAS. Vezava liganda FasL na receptor FAS povzroči njegovo trimerizacijo in združevanje domen smrti na znotrajcelični strani. Preko domen smrti se na receptor veže adaptor FADD. Molekula FADD vsebuje tudi domene DED preko katerih veže prokaspazo-8 in jo aktivira. Kaspaza-8 lahko sproži apoptozo ali preko aktivacije kaspaze-3 ali preko cepitve molekule Bid, ki sproži notranjo mitohondrijsko pot (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).

#### 1.2.3.1.2 Aktivacija receptorja TNF

Dejavnik tumorske nekroze je večfunkcijski vnetni citokin, ki ga proizvajajo makrofagi. Sodeluje pri avtoimunskih obolenjih, raku in neurodegenerativnih boleznih. Poglavitna TNF receptorja sta TNF-R1 in TNF-R2. TNF-R1 se nahaja v vseh tkivih in je glavni posredovalec signaliziranja receptorja TNF, TNF-R2 pa najdemo predvsem v imunskem sistemu (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).

Aktivacija receptorja TNF ne sproži celične smrti spontano (Wajant et al., 2003). Po vezavi liganda TNF na receptor TNF-R1 se z receptorja sprosti protein SODD (Jiang et al., 1999). Na citosolno stran receptorja se najprej veže adaptor TRADD in nato FADD ter prokaspaza-8 ali prokaspaza-10. Na TRADD se lahko vežejo tudi adaptorski molekuli TRAF-2 in RIP. Vezava MAPKKK na TRAF2 sproži aktivacijo JNK (Chen and Goeddel, 2002). Aktivna kinaza JNK se prestavi v jedro, kjer vpliva na aktivnost transkripcijskih faktorjev, kot sta c-Jun in ATF-2. Faktor c-Jun ima pomembno vlogo pri celični delitvi, diferenciaciji in tudi apoptozi (Shaulian and Karin, 2002). Ob sprožitvi apoptoze kinaza JNK sproži cepitev proteina Bid in tvorbo tBid, ki selektivno sproži sprostitvev Smac/Diablo iz mitohondrija ter aktivacijo kaspaze-8 (Deng et al., 2003). Protein RIP sodeluje pri aktivaciji transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B (Wajant et al., 2003). V celici je NF- $\kappa$ B vezan z inhibitorjem I- $\kappa$ B. Ob aktivaciji receptorja TNF-R1 se kompleks IKK aktivira in fosforilira inhibitor I- $\kappa$ B ter ga tako označi za razgradnjo s proteasomom. NF- $\kappa$ B se sprosti v citosol in potuje v jedro, kjer vpliva na izražanje številnih genov pomembnih za celično preživetje (XIAP, c-IAP1, c-IAP2,...) (Wajant et al., 2003). Vezava liganda TNF na receptor TNF-R1 sproži apoptozo le v primeru, ko je aktivacija NF- $\kappa$ B zavrta, t.j. ob inhibiciji proteinske sinteze ali ob izbitju gena za inhibitor NF- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B (Slika 5) (Wajant et al., 2003; Jin and El-Deiry, 2005).

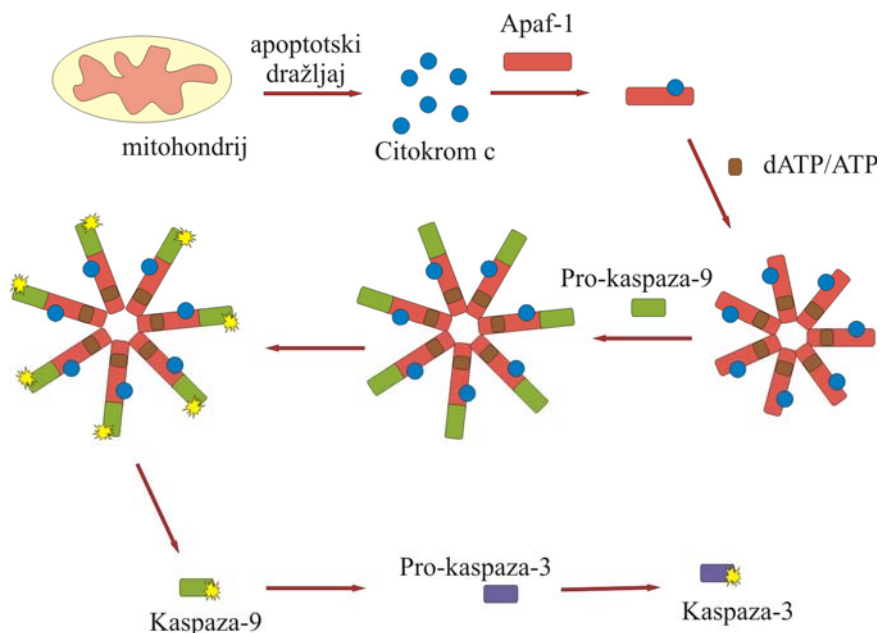


Slika 5: Pot apoptoze sprožena preko receptorja *TNF-R1*. Vezava liganda *TNF* na receptor *TNF-R1* povzroči sprostitvev proteina *SODD* ter nastanek receptorskega kompleksa na citosolni strani, ki vsebuje pomembne adapterske molekule, kot so *TRADD*, *TRAF-2*, *RIP* in *FADD*. Na adaptorsko molekulo *TRADD* se lahko veže *FADD*, ki sproži aktivacijo prokaspaze-8 (-10) in posledično apoptozo. Na *TRADD* se lahko vežejo tudi adaptorski molekuli *TRAF-2* in *RIP*. Vezava *MAPKKK* na *TRAF2* sproži aktivacijo *JNK*. Protein *RIP* pa sodeluje pri aktivaciji transkripcijskega faktorja *NF-κB*, ki vpliva na izražanje številnih genov pomembnih za preživetje (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).

### 1.2.3.2 Notranja (mitohondrijska) pot

Poškodba celice zaradi sevanja, delovanja citotoksičnih snovi, odsotnosti dejavnikov preživetja in drugih škodljivih vplivov lahko sproži notranjo oziroma mitohondrijsko pot apoptoze (Green and Reed, 1998; Green and Kroemer, 2004). Vsi ti apoptotski dražljaji privedejo do ključnih biokemičnih sprememb v mitohondrijih, glavna značilnost pa je povečanje prepustnosti zunanje mitohondrijske membrane in sprošanje citokroma *c* ter drugih proteinov, ki se normalno nahajajo v medmembranskem prostoru iz mitohondrija.

V citosolu se citokrom *c* poveže s adapterskim proteinom *Apaf-1* na domeno *WD40*, ki se nahaja na C-terminalnem koncu proteina ter z *dATP/ATP* (Shi, 2001). Konformacijska sprememba proteina *Apaf-1* omogoči izpostavitvev N-terminalne domene *CARD*, ki se z elektrostatskimi vezmi veže s homologno domeno *CARD* prokaspaze-9. Nastane heptamerni kompleks, apoptosom (Kaufmann and Hengartner, 2001; Acehan et al., 2002). Prokaspaza-9 se v apoptosomu konformacijsko spremeni in posledično aktivira kaspazo-3 (Slika 6) (Li et al., 1997; Shi, 2001).



Slika 6: *Shematski prikaz aktivacije prokaspaze-9 na apoptosomu.* Po sprostitvi iz mitohondrija v citosol, se citokrom c veže z adapterskim proteinom Apaf-1 in z dATP/ATP. Konformacijska sprememba proteina Apaf-1 omogoči izpostavitve domene CARD na katero se veže CARD domena prokaspaze-9. Nastali kompleks imenujemo apoptosom. V apoptosomu se prokaspaza-9 konformacijsko spremeni in aktivira (povzeto po Wang, 2001).

Zunanja in notranja pot sta med seboj povezani preko proapoptotske molekule Bid, iz družine Bcl-2 proteinov (Slika 5) (Li et al., 1998).

#### 1.2.4 Substrati kaspaz

Kaspaza-3, ki je najbolj razširjena kaspaza v celici, je odgovorna za večino apoptotskih cepitev. Pri tem ji pomagata še ostali dve izvršitveni kaspazi, kaspaza-6 in -7. Skupaj cepijo številne celične beljakovine, kar povzroči številne spremembe v celici, kot so porušenje homeostaze, ustavitve celičnega cikla, inaktivacijo zaviralcev apoptoze, strukturne spremembe in označitev apoptotske celice (spremembo antigenov na površini celice) (Nicholson, 1999). Znanih je približno 300 tarčnih beljakovin – kaspaznih substratov (Fischer et al., 2003). Mednje sodijo beljakovine, ki sodelujejo v celičnem signaliziranju, beljakovine citoskeleta in jedrnega matriksa, zaviralci endonukleaz in drugi. Ena najpomembnejših beljakovin, ki jih cepi kaspaza-3 je ICAD. Beljakovina ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) je zaviralec endonukleaze CAD (caspase-activated deoxyribonuclease). Kaspaza-3 cepi ICAD, s tem pa postane CAD aktivna in cepi jedrno DNA (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998). Kaspaze cepijo številne proteine v jedru in s tem sprožijo njegovo uničenje. Kaspazi -3 in -7 cepita jedrni encim poliADP-ribozo polimerazo (PARP), ki je vključen v popraviljanje DNA. Za brstenje membrane je ključna cepitev številnih substratov kot so gelsolin ter kinazi ROCK-1 in PAK2. Kaspaza-3 cepi gelsolin, po cepitvi nastane aktivni fragment, ki depolimerizira F-actin (Kothakota et al., 1997). Kaspaze cepijo tudi številne proteine vključene v ohranjanje citoskeletne arhitekture in številne proteine, ki sodelujejo pri prenosih signala. Med substrati kaspaz sta tudi regulatorja apoptoze, proteina Bcl-2 in Bcl-xL, ter inhibitor kaspaze-8 cFLIP (Earnshaw et al., 1999; Nicholson, 1999; Fischer et al., 2003; Timmer and Salvesen, 2007). V večini primerov je za aktivacijo tarčnih proteinov potrebna le cepitev s kaspazo. Za aktivacijo Acinusa, DNA helikazo, ki sodeluje pri kondenzaciji kromatina in preoblikovanju jedra, pa ni zadostna samo cepitev s kaspazo, ampak je potrebna še dodatna cepitev z drugimi proteazami (Sahara et al., 1999).

#### 1.2.5 Od kaspaz neodvisna celična smrt

Pri sesalcih opazimo poleg apoptoze in nekroze še apoptozi podobno in nekrozi podobno celično smrt, avtofagijo in nekrozno smrt, sproženo z receptorji smrti (Leist and Jäätelä, 2001a). Pri teh oblikah celične smrti se velikokrat ne aktivirajo kaspaze, ampak imajo pomembno vlogo druge proteaze, kot so grancimi, lizosomski katepsini, kalpaini, serinske proteaze, idr. (Lockshin and Zakeri, 2004). Pri vseh teh oblikah celične smrti pride do kondenzacije kromatina, vendar v različnih oblikah in intenzitetah (Leist and Jäätelä, 2001a). Pri z receptorji sproženi nekrozi in avtofagiji se kromatin ne kondenzira, tako kot pri

apoptozi (Jäättelä and Tschopp, 2003). Celice, ki odmirajo z apoptozi podobno ali nekrozi podobno celično smrtjo lahko kažejo tudi vrsto sprememb, ki so podobne apoptozi, kot so izpostavitve fosfatidilserina, skrčenje citoplazme, izguba mitohondrijskega membranskega potenciala, brstenje plazemske membrane, tvorba apoptotskih teles in celo aktivacija kaspaz (Leist and Jäättelä, 2001a). Apoptoza in nekroza sta med seboj povezani, saj so deli signalnih poti (in nekateri morfološki znaki) celic, ki odmirajo z različnimi oblikami celične smrti, podobni (Lockshin and Zakeri, 2002; Jäättelä and Tschopp, 2003). Kinaza RIP, ki je ključnega pomena pri nekrozi sproženi s TNF, lahko inhibira izmenjavo ATP/ADP na mitohondrijski membrani preko neposredne vezave na ANT (angl. adenine nucleotide translocator) in tako povzroči destabilizacijo mitohondrijev in celično smrt (Temkin et al., 2006). Avtofagija je oblika celične smrti, ki v celici predstavlja mehanizem za obrambo proti stresu (ob pomankanju hranil ali ravnih dejavnikov), ima pa pomembno vlogo tudi pri apoptozi (Tardy et al., 2006). Proteini Atg, ki so vpleteni v tvorbo avtofagičnih vakuol in avtofagosomov med procesom avtofagije, se lahko vežejo s pro- in anti-apoptotskimi proteini (Pattinire et al., 2005).

Pred kratkim je bila objavljena študija, kjer je skupina strokovnjakov glede na morfološke značilnosti umirajoče celice opredelila apoptozo, avtofagijo, nekrozo in kornifikacijo kot glavne modele celične smrti. Vse ostale oblike celične smrti, kot so mitotska katastrofa, anoikis, paraptoza, idr, pa uvrstijo v t.i. atipične oblike celične smrti (Kroemer et al., 2009).

Različne oblike celične smrti so za organizem zelo pomembne, predvsem pri različnih boleznih, kot je npr. rak, kjer je apoptotski mehanizem velikokrat inaktiviran. Različne oblike celične smrti imajo pomembno vlogo tudi pri negativni selekciji limfocitov pri poškodbi ledvic sproženi s TNF in odstranjevanju hondrocitov med rastjo kosti (Leist and Jäättelä, 2001a).

## 1.3 Regulacija apoptoze

### 1.3.1 Proteini iz družine Bcl-2

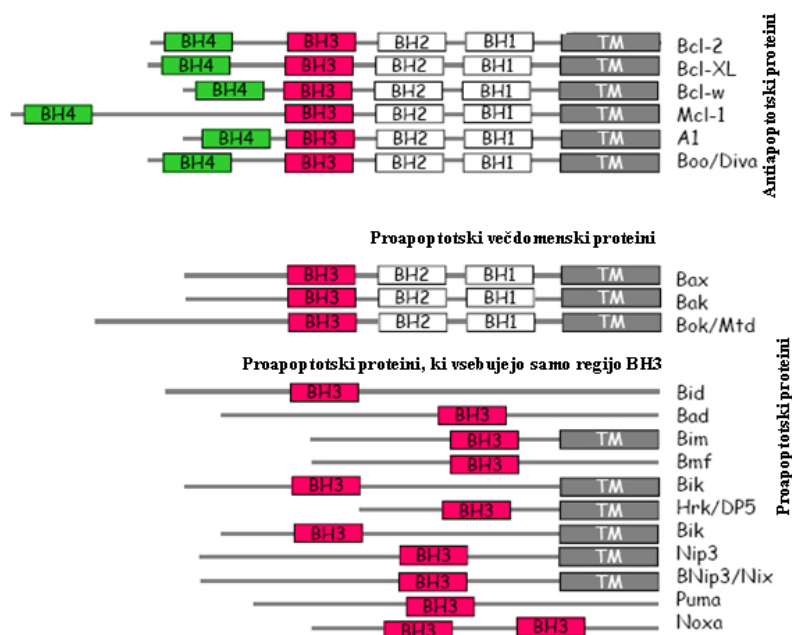
Pravo revolucijo v pojmovanju mitohondrijev je od leta 1990 prineslo odkritje proto-onkogene Bcl-2, saj so mitohondriji poleg tvorbe energije za celotno celico dobili ključno vlogo pri regulaciji programirane celične smrti (Chen-Levy and Clearly, 1990; Hockenbery et al., 1990). Danes je poznanih okrog 20 proteinov iz te družine (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).

#### 1.3.1.1 Delitev Bcl-2 proteinov

Glede na njihovo funkcijo in strukturo jih lahko razdelimo na antiapoptotske proteine, ki zavirajo apoptozo, ter proapoptotske proteine, ki apoptozo pospešujejo (Slika 7) (Adams and Cory, 1998).

V družino antiapoptotskih proteinov uvrščamo proteine Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, idr (Adams and Cory, 1998; Gross et al., 1999). Sestavljeni so iz štirih kratkih ohranjenih zaporedij BH (Bcl-2 homology domain) ter hidrofobnega C-terminalnega zaporedja (transmembranska regija; TM), s katerim se vežejo na zunanjo mitohondrijsko membrano. Lahko jih najdemo celo na membrani endoplazemskega retikuluma, kjer regulirajo koncentracijo  $Ca^{2+}$ , in jedrni membrani ter porazdeljene po citosolu. Od tu se po sprožitvi apoptoze premestijo na zunanjo mitohondrijsko membrano (Boehning et al., 2003).

Družino proapoptotskih proteinov pa razdelimo še na dve podskupini. Prva podskupina so proapoptski proteini, sestavljeni iz treh BH domen (BH1-BH3) ter hidrofobnega C-terminalnega zaporedja. Sem spadajo Bax, Bak, Bok, idr. Druga podskupina pa so proteini, ki vsebujejo le regijo BH3 (BH3-only proapoptotic members), katera je tudi ključna pri interakciji z ostalimi proapoptotskimi in antiapoptotskimi proteini. Sem pa uvrščamo proteine BimL/Bod, Bad, Bid, Bmf, Noxa, Puma, idr. Vsi proapoptski proteini se nahajajo v citosolu, razen proteina Bak, ki ga najdemo tudi na zunanji mitohondrijski membrani (Adams and Cory, 1998; Gross et al., 1999; Kaufmann and Hengartner, 2001).



Slika 7: Razdelitev proteinov iz družine Bcl-2 po funkciji in strukturi. Proteine iz družine Bcl-2 delimo na antiapoptotske in proapoptotske. Proapoptotske delimo na dve podskupini, na proapoptotske proteine, sestavljene iz treh BH domen in na tiste, ki vsebujejo le regijo BH3 (povzeto po Gross et al., 1999).

### 1.3.1.2 Način delovanja proteinov iz družine Bcl-2

Antiapoptotski proteini delujejo na ta način, da se vežejo na proapoptotske proteine in prav razmerje med antiapoptotskimi in proapoptotskimi proteini je tisto, ki odloča o občutljivosti celic za apoptozo (Danial and Korsmeyer, 2004). Kristalna struktura proteina Bcl-xL je pokazala, da je organiziranost vseh treh domen BH (BH1, BH2 in BH3) antiapoptotskih proteinov taka, da so si zelo blizu ena drugi. Tvorijo tako imenovani hidrofobni žep, v katerega se lepo prilega BH3 domena proapoptotskih proteinov (Fesik, 2000; Hengartner, 2000). Heterodimerizacija med proapoptotskimi in antiapoptotskimi proteini je tako način njihovega delovanja (Chou et al., 1999).

Proapoptotski proteini se v celicah nahajajo kot monomeri. Bax se nahaja pretežno v citosolu, lahko pa je tudi rahlo vezan na zunanjo mitohondrijsko membrano. Po sprejemu apoptotskega dražljaja pride do konformacijskih sprememb na obeh koncih proteina, premesti se na zunanjo mitohondrijsko membrano in oligomerizira. Tu tvori supramolekularne odprtine sam, ali v povezavi z Bak ali tBid (Kuwana et al., 2002). Protein Bak pa se nahaja na zunanji mitohondrijski membrani in se po sprožitvi apoptoze prav tako konformacijsko spremeni, kar vodi v nastanek večjih oligomernih kompleksov (Danial and Korsmeyer, 2004). Oligomerizacija proteina Bax in Bak na zunanji mitohondrijski membrani tako olajša spuščanje citokroma c v citosol (Shi, 2001). Med obema proteinoma pride tudi do homooligomerizacije in interakcije med enim in drugim (Mikhailov et al., 2003).

Pri normalnih pogojih v celici se proapoptotski proteini, ki vsebujejo samo regijo BH3, nahajajo v neaktivni obliki. Različni apoptotski dražljaji povzročijo izvršitev njihovih proapoptotskih funkcij. Bid lahko cepijo kaspaza-8, grancim B, katapsini in kalpaini (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Chen et al., 2001; Stoka et al., 2001; Mandic et al., 2002; Cirman et al., 2004). Pomanjkanje rastnih faktorjev vodi do defosforilacije proteina Bad in posledično njegove interakcije z antiapoptotskimi proteini (Datta et al., 1997). Razne poškodbe DNA pa vodijo v aktivacijo proteina p53, ki sproži transkripcijo proteinov PUME, Noxe in Bim (Puthalakath and Strasser, 2002; Borner, 2003). Proteini, ki vsebujejo samo regijo BH3, lahko delujejo na dva načina, kot olajševalci ali kot aktivatorji. Olajševalci (Bad, Noxa, Bik) delujejo tako, da se preferenčno vežejo na antiapoptotske proteine in tako preprečijo vezavo antiapoptotskih proteinov s proapoptotskimi proteini. Proapoptotski proteini lahko tako sprožijo poškodbo zunanje mitohondrijske membrane. Aktivatorji, kot je npr. tBid pa direktno aktivirajo proapoptotske proteine, kot sta Bax in Bak (Letai et al., 2002).

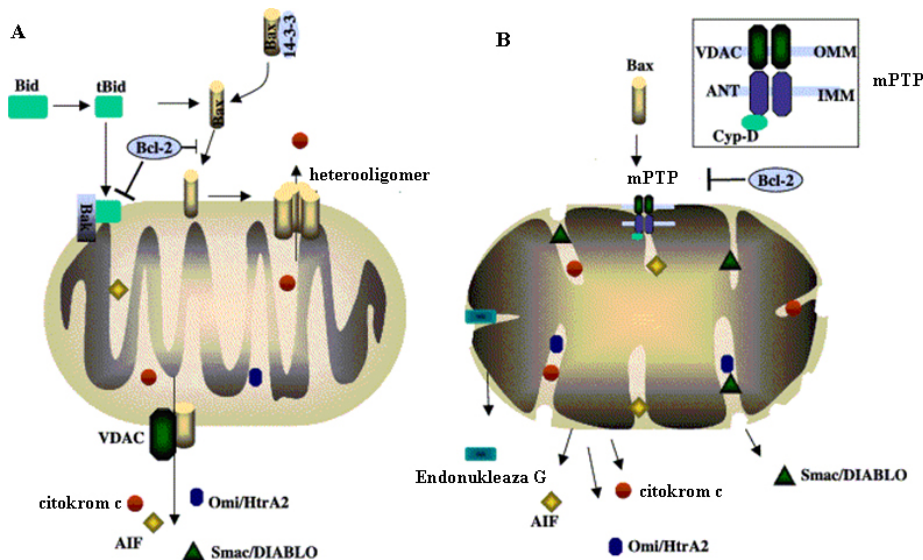
### 1.3.1.3 Mehanizmi sproščanja citokroma c iz mitohondrijev s pomočjo proteinov iz družine Bcl-2

Mehanizem sproščanja citokroma c iz mitohondrija je kompleksen in še ni v celoti poznan. Obstaja več hipotez, ki poskušajo razložiti sproščanje citokroma c.

Znano je, da lahko konformacijske spremembe Bax ali Bak ter njihova premostitev na zunanjo mitohondrijsko membrano v obliki homooligomerov ter tvorba velike pore omogoči poškodbo mitohondrija (Kuwana et al., 2002). Možni mehanizmi so, da se lahko Bax veže s proteini VDAC na zunanji strani mitohondrijske membrane in ANT ter ciklofilinom D na notranji strani mitohondrijske membrane, ki sestavljajo veliko prevodno poro (mPTP). Pora se zelo jasno odpre pod specifičnimi in običajno patološkimi pogoji, ter premosti notranjo in zunanjo mitohondrijsko membrano, kar vodi do iztekanja citokroma c in ostalih proapoptotskih proteinov v citosol (Slika 8) (Kroemer and Reed, 2000; Kuwana et al., 2002).

Druga hipoteza temelji na strukturni podobnosti Bcl-2 proteinov z bakterijskimi toksini, ki tvorijo pore, in pravi, da lahko homooligomeri proteina Bax ali Bak sami tvorijo pore na mitohondrijski membrani in s tem omogočijo sprostitve citokroma c. Pokazali so, da lahko rekombinanti Bax oligomerizira in tvori pore v umetnih liposomih (Antonsson et al., 2000; Kuwana et al., 2002). Možen je pa tudi mehanizem, kjer Bax ali Bak vplivata na permeabilizacijo mitohondrijske membrane brez tvorbe por (Basanez et al., 2002). Bid in ostali proapoptotski proteini, ki vsebujejo samo BH3 domeno, ne vplivajo neposredno na permeabilizacijo mitohondrijske membrane ampak posredno s pomočjo ostalih proapoptotskih ali antiapoptotskih proteinov (Slika 8) (Shimizu and Tsujimoto, 2000).

Še vedno ni tudi jasno, kako antiapoptoski proteini pripomorejo k poškodbi zunanje mitohondrijske membrane in posledičnega iztekanja citokroma c. Študije kažejo, da se lahko tudi Bcl-2 in Bcl-xL vežeta s proteinoma VDAC (angl. voltage dependent anion channel) in ANT (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 2000). Te študije so narejene na dvohibridnih sistemih kvasovk, ko-imunoprecipitaciji in funkcijskih testih, ki kažejo, da se lahko Bax, Bcl-2 ali Bcl-xL vežejo z ANT in tako lahko nastane ANT neselektivna pora, ki prepušča substrate velike do 1,5kDa. Bax lahko interagira z ANT in omogoči tvorbo te pore, medtem ko pa Bcl-2 in Bcl-xL inhibirata nastanek te pore (Loeffler and Kroemer, 2000). Nekateri avtorji pa trdijo, da je vloga antiapoptotskih proteinov le v tem, da onemogočajo aktivacijo proapoptotskih proteinov na zunanji mitohondrijski membrani (Slika 8) (Letai et al., 2002).



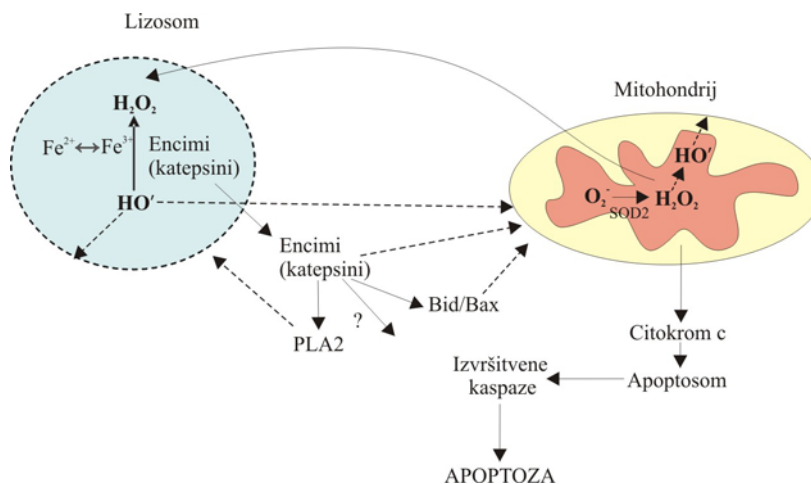
Slika 8: *Mehanizmi poškodbe zunanje mitohondrijske membrane.* (A) Nastanek por s pomočjo proteinov iz družine Bcl-2. Interakcija Bax/Bak s tBid povzroči konformacijske spremembe na Bax/Bak, Bax se premesti na zunanjo mitohondrijsko membrano in oligomerizira. Nastali heterooligomeri lahko sami tvorijo pore v zunanji mitohondrijski membrani, kjer pride do iztekanja citokroma c. Bax/Bak pa lahko interagirata tudi z ostalimi proteini (VDAC) na zunanji mitohondrijski membrani, kjer prav tako pride do tvorbe por in izpusta proapoptotskih proteinov iz mitohondrija. (B) Odprtje PTP kompleksa. PTP kompleks je sestavljen iz VDAC na zunanji mitohondrijski membrani (OMM), iz ANT na notranji mitohondrijski membrani (IMM) ter iz ciklofilina D v matriksu. Odprtje PTP kompleksa povzroči padec mitohondrijskega membranskega potenciala. Proapoptotski proteini, kot sta Bax in Bak povzročijo odprtje PTP kompleksa, antiapoptoski pa njegovo zaprtje (povzeto po Donovan and Cotter, 2004).

### 1.3.1.4 Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) pri poškodbi mitohondrijske membrane

Mitohondriji so glavni vir reaktivnih kisikovih zvrsti. To so izredno reaktivne in kratkožive molekule. Ocenjeno je, da okoli 1-2% vsega kisika v mitohondrijih tvori reaktivne kisikove zvrsti (Boveris and Chance, 1973).

Vloga ROS in njihov nastanek v mitohondrijih med procesom apoptoze še ni dokončno pojasnjena. Nekateri trdijo, da je tvorba ROS samo nekakšen stranski produkt premestitve citokroma c in da nima večje vloge v apoptozi (Kluck et al., 1997). Drugi trdijo, da imajo ROS nasprotni učinek na aktivacijo kaspaz. Večina študij pa trdi, da ROS igrajo ključno vlogo v procesu apoptoze, tako pri ojačanju apoptotskega odgovora, kot v uničevanju pomembnih celičnih komponent. Pri apoptotskih dražljajih, ki sprožijo permeabilizacijo mitohondrijev in iztekanje citokroma c, pride do porušanja transporta elektronov, kar vodi v nastanek ROS. Na ta način lahko ROS tudi sodelujejo pri odpiranju PTP kompleksa (Garrido et al., 2006).

Tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti v mitohondrijih je lahko tudi posledica destabilizacije lizosomske membrane (Roberg et al., 1999; Zhao et al., 2003). Nastanek mitohondrijskih reaktivnih kisikovih zvrsti pa lahko zatem še pripomore k še večji destabilizaciji lizosomske membrane (Slika 9) (Zhao et al., 2003).



Slika 9. Predlagani mehanizem medsebojnega vpliva med lizosomi in mitohondriji preko nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti. Pri apoptotskih dražljajih, ki sprožijo permeabilizacijo mitohondrijev in iztekanje citokroma c, pride do porušanja transporta elektronov, kar vodi v nastanek ROS. Vodikov peroksid, ki nastane v mitohondrijih, lahko difundira v lizosome, kjer preko Fentonove reakcije povzroči nastanek visoko toksičnega hidroksilnega radikala, ki povzroči poškodbo lizosomske membrane (povzeto po Brunk et al., 2001).

### 1.3.2 Mitohondrijski proteini

Med apoptozo se poleg citokroma c iz mitohondrija v citosol sprostijo še številni drugi proapoptotski proteini (Slika 8), med njimi, endonukleaza G, Smac oz. Diablo in Omi/HtrA2 (Kroemer et al., 2007). Mehanizem sproščanja teh proteinov iz mitohondrijev še ni poznan, vendar je verjetno podoben kot mehanizem sproščanja citokroma c, saj se citokrom c in Smac/Diablo iz mitohondrijev sprostita istočasno (Vander Heiden and Thompson, 1999; Borner, 2003).

Endonukleaza G se med apoptozo premesti v jedro, kjer cepi DNA (Li et al., 2001). Smac/Diablo in serinska proteaza Omi/HtrA2 pa se vežeta na proteine IAP in s tem preprečita inhibicijo kaspaz (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2002). Smac/Diablo po odcepitvi njegove N-terminalne mitohondrijske tarčne sekvence v mitohondriju deluje kot kaspazni agonist, nevtralizira inhibitorno aktivnost proteinov IAP in s tem pospeši od citokroma c odvisno kaspazno aktivacijo. Igra tudi pomembno zaščitno vlogo pri zunanji (receptorski) poti (Deng et al., 2002).

### 1.3.3 Inhibitorji kaspaz

Ker je proteoliza ireverzibilen proces, imamo v celicah vedno prisotne tudi inhibitorje, da zagotavljajo varnost v primeru nezaželene aktivacije (Takahashi, 1999).

### 1.3.3.1 Inhibitorji apoptoze IAP

Do sedaj je poznanih osem človeških homologov, med njimi NAIP, c-IAP1, cIAP2, XIAP in survivin (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005). Na N-terminalnem koncu vsebujejo proteini IAP 1-3 regije BIR (Deveraux and Reed, 1999). Poleg regije BIR imajo na C-terminalnem koncu regijo RING, ki deluje kot ubikvitin ligaza (Vaux and Silke, 2005). Med vsemi proteini IAP, je XIAP najbolj raziskan in najboljši inhibitor kaspaz. Protein XIAP se veže na aktivirane kaspaze (kaspazo-3, -7 in -9) in jih inhibira. Strukturne študije kompleksa XIAP s kaspazo-3, -7 in -9 so pokazale, da N-terminalna povezovalna regija pred BIR2 regijo zavzame aktivno mesto kaspaze-3 in -7 in na ta način prepreči vstop substrata, regija BIR2 pa stabilizira to interakcijo. Pri inhibiciji kaspaze-9 pa je bistvenega pomena regija BIR3 (Salvesen and Duckett, 2002; Stennicke et al., 2002; Eckelman et al., 2006). Proteina cIAP1 in cIAP2 se prav tako vežeta na kaspaze, vendar njuna vezava ne vpliva na aktivnost kaspaz (Eckelman and Salvesen, 2006).

Smac/diablo je negativni regulator proteinov IAP. Vsebuje namreč ohranjen motiv štirih zaporednih aminokislin (najdemo ga tudi pri HtrA2/Omi), ki se lahko veže na XIAP in s tem sprostijo kaspazo iz kompleksa z inhibitorjem (Creagh et al., 2004).

### 1.3.3.2 p35

Bakulovirusni protein p35 je ireverzibilni inhibitor večine človeških kaspaz (Snipas et al., 2001; Stennicke et al., 2002). Vsebuje ohranjeno sekvenco DQMD'G, ki deluje podobno kot substrat za kaspaze (Bump et al., 1995). Celičnih homologov še niso našli.

### 1.3.3.3 CrmA

Virusni protein CrmA, ki spada v družino serinskih proteaznih inhibitorjev, inhibira kaspazi-1 in -8 ter grancim B (Snipas et al., 2001). Kaspaze inaktivira tako, da se veže v aktivno mesto in tam tudi ostane (Ray et al., 1992; Stennicke et al., 2002).

### 1.3.3.4 FLIP

Protein FLIP je kaspazi-8 podoben protein, ki vsebuje dve domeni DD, s katerima se veže na FADD in tako prepreči vezavo prokaspaze-8 in -10 v kompleks DISC in posledično njuno aktivacijo (Earnshaw et al., 1999). Obstaja krajša oblika proteina FLIP (cFLIPs) ter daljša oblika (cFLIP<sub>L</sub>). Obe obliki proteina lahko preprečita aktivacijo kaspaze-8 in -10 (Krueger et al., 2001).

## 1.4 Lizosomi in apoptoza

Še do pred kratkim je veljalo, da igrajo lizosomi večjo vlogo le v nekrozi in avtofagiji. Njihova vloga v procesu apoptoze pa je bila omejena le na odstranjevanje in uničevanje apoptotskih teles (Ferri and Kroemer, 2001; Leist and Jäätelä, 2001b). Prav tako so tudi mislili, da je vloga lizosomskih proteaz le razgradnja proteinov v lizosomih. Študije pa so pokazale, da lizosomi niso samo celični organeli, kjer poteka razgradnja proteinov, ampak lahko tudi na različne načine sodelujejo v procesu apoptoze. Pri apoptozi pride do delne destabilizacije lizosomov, v citosol se sprostijo lizosomski encimi, ki s cepitvijo ali razgradnjo proteinov pripomorejo k izvršitvi apoptoze (Guicciardi et al., 2004). V primeru nekroze pa pride do močne poškodbe lizosomov iz katerega se sprostijo visoka koncentracija lizosomskih encimov (Bursch, 2001; Turk et al., 2002a).

### 1.4.1 Lizosomske cisteinske proteaze – katepsini

Katepsini so skupina proteaz, ki se v glavnem nahajajo v lizosomu. Njihova glavna naloga je razgradnja proteinov do krajših peptidov ali posameznih aminokislin. Cisteinske proteaze ali katepsini so v lizosomu najštevilčnejše zastopana skupina (Turk et al., 2000). Uvrščamo jih v klan CA, družino C1, v skupino papainu podobnih cisteinskih proteaz (Rawlings and Barret, 1993). Družina vsebuje še papain in sorodne rastlinske proteaze, kot so kimopapain, karikain, bromelain, aktinidin, ficin, kruzipain in sorodne parazitske proteaze. Pri človeku poznamo 11 cisteinskih katepsinov (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X) (Turk et al., 2000; Turk et al., 2001; Turk et al., 2002b). Poleg cisteinskih proteaz poznamo še aspartatne proteaze kot sta katepsin D in E (Barrett et al., 2004a) ter serinske proteaze, med katere uvrščamo katepsin G (Barrett et al., 2004b).

#### 1.4.1.1 Sinteza, struktura in mehanizem delovanja katepsinov

Katepsini se sintetizirajo v obliki preproencima na ribosomih endoplazemskega retikuluma. Glikolizirajo in

fosforilirajo se v golgijevem aparatu. Vezava na manozo-6-fosfatne receptorje pa jih usmeri na endosomalne vezikle. Prepeptid se odstrani pri transportu iz endoplazemskega retikuluma, nastali propeptid pa se aktivira v zrel encim v kislem okolju poznih endosomov ali lizosomov (Turk et al., 2000; Turk et al., 2001). N-terminalni propeptid, ki se proteolitsko odstrani med aktivacijo v lizosomih, je odgovoren za pravilno usmerjanje encimov (Hanewinkel et al., 1987; Cuozzo et al., 1995), stabilnost, pravilno zvijanje (Tao et al., 1994), zmožen je pa tudi specifične inhibicije zrelega encima *in vitro* (Cygler and Mort, 1997). Propeptid vsebuje domeno, ki na koncu katalitičnega mesta vsebuje  $\alpha$ -heliks, ki se nadaljuje v obratni smeri vezave substrata, počez reže z aktivnim mestom, proti N-terminalnemu koncu zrelega encima. *In vitro* se odcep N-terminalnega propeptida zgodi bodisi avtokatalitsko bodisi z drugimi proteazami. Endopeptidaze se aktivirajo avtokatalitsko, medtem ko eksopeptidaze potrebujejo za aktivacijo druge endopeptidaze (Turk et al., 2001). Odcepitev propeptida omogoči padec vrednosti pH, kjer kisli pH zrahlja povezavo med katalitskom delom molekule in propeptidom, ki se tako odcepi (Rozman et al., 1999). Izjema je le katepsin C, saj del propeptida ostane vezan na katalitski del encima tudi v zrelem katepsinu (Turk et al., 2001).

Katepsini so optimalno aktivni v kislem pH, v nevtralnem območju pa le krajši čas. Katepsin L je v nevtralnem območju aktiven le nekaj minut, katepsini B, H in K pa dalj časa. Izjema je katepsin S, ki je aktiven celo pri vrednostih pH nad 8 (Turk et al., 2002a).

Katepsini so v večini majhne molekule z molsko maso približno od 24-35 kDa, z izjemo katepsina C, ki je oligomeren encim z molsko maso približno 200 kDa. Struktura je iz dveh domen, domene L in domene R. Domena L je sestavljena iz alfa vijačnice, domena R pa pretežno iz beta sodčka (Turk et al., 2001). Vmesna površina obeh domen tvori na vrhu tako imenovano V obliko reže z aktivnim mestom. V sredini reže se nahajata aminokislini v aktivnem mestu, Cys25 in His159. Katalitski Cys je na N-terminalnem delu alfa vijačnice in tvori ionski par s His, ki je na beta sodčku (Turk et al., 2001).

Večina katepsinov je endopeptidaz (B, L, S, K, F, D, V, H, O, W), nekateri so eksopeptidaze (B, X, C, H) (Turk et al., 2001).

Katepsini imajo široko specifičnost, z določenimi preferencami za hidrofobne ali bazične aminokisliline na mestu P2. Za specifičnost katepsinov so pomembna mesta S1, predvsem pa S2 in S1' (Turk et al., 1998).

#### 1.4.1.2 Regulacija aktivnosti katepsinov

Aktivnost katepsinov se uravnava na več ravneh. Poleg tega, da se sintetizirajo kot neaktivni proencimi, da so od ostalih delov celice ločeni s polprepustno lizosomsko membrano, da so v citosolu regulirani z nevtralnimi pH, je njihova aktivnost uravnavana tudi z njihovimi endogenimi inhibitorji, kot so cistatini, tirocini in nekaterimi serpini (Turk et al., 1997; Turk et al., 2001).

Inhibitorje cisteinskih proteaz, cistatine, razdelimo na podlagi sekvenčne homologije na znotrajcelične stefine ter zunajcelične cistatine in kininogene (Barret et al., 1986; Turk et al., 2008). Stefini so večinoma znotrajcelični enoverižni proteini z molsko maso približno 11 kDa (Turk and Bode, 1991; Turk et al., 2002b), lahko pa jih najdemo tudi zunaj celice (Abrahamson et al., 1986). Pri sesalcih sta poznana stefin A in stefin B (Turk et al., 1997), kasneje pa so identificirali še goveji stefin C (Turk et al., 1993) in prašičji stefin D (Lenarčič et al., 1996). Stefin B ima slabšo afiniteto vezave na cisteinske proteaze kot stefin A (posebej na katepsin B). Stefin A najdemo predvsem v epitelnem in limfnem tkivu, stefin B pa povsod (Turk et al., 1993). Cistatini so zunajcelični enoverižni proteini z molsko maso približno 13 kDa. So reverzibilni kompetitivni inhibitorji (Turk et al., 2002b), njihova vezava na katepsine pa je nespecifična (Turk et al., 2001). Kininogeni so prav tako zunajcelični proteini. Pri sesalcih najdemo tri različne vrste kininogenov in sicer H - kininogene (high-Mr), in L - kininogene (low Mr) ter T kininogene (DeLa Cadena and Colman, 1991). So edini inhibitorji iz družine cistatinov, ki poleg lizosomskih proteaz inhibirajo tudi kalpaine (Abrahamson et al., 1986).

Serpini so inhibitorji serinskih proteaz, ki v nekaterih primerih inhibirajo tudi cisteinske proteaze (Bjork et al., 1998)

#### 1.4.1.3 Fiziološka vloga katepsinov

Poleg razgradnje proteinov v lizosomih, imajo katepsini še druge fiziološke vloge v celici (Turk et al., 2000).

Katepsini lahko sodelujejo pri procesiranju in aktivaciji proteinov. Katepsini B, L in K verjetno sodelujejo pri proteolizi tiroglobulina v tiroidnih žlezah, kjer sprostijo tiroksin in tironin (Dunn et al., 1991; Brix et al., 1996; Friedrichs et al., 2003). Katepsin B je vključen v aktivacijo prekursorja  $\beta$ -galaktozidaze (Okamura-Oho et al., 1997), renina (Jutras and Reudelhuber, 1999) in tripsina (Halangk et al., 2000). Katepsin C pa lahko aktivira številne serinske proteaze, kot so grancim A in B, katepsin G, nevtrofil elastazo in proteinazo 3 (Pham and Ley, 1999).

Nekatere cisteinske proteaze so tkivno specifične in tako sodelujejo v bolj specializiranih celičnih

procesih. Katepsin K, ki ga najdemo v osteoklastih, ima ključno vlogo pri preurejanju in resorpciji kosti (Chapman et al., 1997). Skupaj s katepsinom S imata tudi pomembno vlogo pri procesiranju in prezentiranju antigenov (Chapman et al., 1997). Fenotip mišk z izbitim genom za katepsin S kaže spremembe v imunskem odgovoru (Shi et al., 1999). Katepsin L sodeluje pri diferenciaciji melanocitov in keratinocitov med razvojem lasnih foliklov (Reinheckel et al., 2001; Tobin et al., 2002). Miškam z izbitim genom za katepsin L se 21 dan po rojstvu začne periodično odpadanje dlak in ponovna rast (Reinheckel et al., 2001).

Katepsini B, H in L imajo tudi vlogo pri širjenju tumorjev, kjer razgrajujejo komponente zunajceličnega matriksa (Lah and Kos, 1998). Povečano izražanje in aktivnost katepsina B in/ali D so odkrili v rakastih celicah dojke (Castiglioni et al., 1994), celicah raka debelega črevesja (Campo et al., 1994), raka pljuč (Sukoh et al., 1994) in vrsti ostalih tumorjih (Joyce et al., 2004), kjer predstavlja nivo izražanja katepsinov pomemben prognostični faktor.

Katepsini lahko sodelujejo tudi pri številnih drugih obolenjih, kot so vnetna obolenja, nevrodegenerativna obolenja ter staranje (Berdowska, 2004).

#### 1.4.1.4 Vloga katepsinov v apoptozi

Katepsini imajo tudi pomembno vlogo pri apoptozi. Z apoptozo povezujejo predvsem katepsine B, L in D, malo pa je znanega o vpletenosti ostalih katepsinov v tem procesu (Turk et al., 2000; Leist and Jäättelä, 2001b; Turk et al., 2002a; Guicciardi et al., 2004). Katepsin B povezujejo z apoptozo hepatocitov sproženo z žolčnimi kislinami (Canbay et al., 2003), apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$  v primarnih hepatocitih in tumorskih celicah (Guicciardi et al., 2001; Foghsgaard et al., 2001), apoptozo nevronov pri Unverricht-Luundborg progresivni mioklonski epilepsiji (EPM1) (Houseweart et al., 2003a), in apoptozo sproženo s pomankanjem hranil v celicah PC12 (Shibata et al., 1998). Kljub temu, da je vloga katepsina B v procesu apoptoze povezana s patološkimi procesi, miške z izbitim genom za katepsin B ne kažejo nobenih morfoloških, funkcijskih sprememb, niti sprememb v obnašanju (Reinheckel et al., 2001).

Katepsin D igra pomembno vlogo pri apoptozi sproženi s stavrosporinom (Bidere et al., 2003), Fas in TNF- $\alpha$  (Deiss et al., 1996; Demoz et al., 2002), oksidativnim stresom (Kagedal et al., 2001a), sfingozinom (Kagedal et al., 2001b), in p53 (Wu et al., 1998). Miške z izbitim genom za katepsin D ne kažejo nobenih bolezenskih znakov ob rojstvu, umrejo pa 26 dni po rojstvu zaradi intestinalne nekroze, tromboembolije in limfopenije (Saftig et al., 1995).

Katepsin L pa je pomemben regulator pri apoptozi sproženi z UV žarki v keratinocitih (Tobin et al., 2002; Welss et al., 2003), in apoptozi sproženi z etopozidom v celicah P39 (Hishita et al., 2001). Miške z izbitima genoma za katepsin B in katepsin L umrejo med drugim in četrtem tednom po rojstvu zaradi masivne apoptoze nevronov in možganske atrofije (Felbor et al., 2002).

Po sprostitvi katepsinov v citosol, se pojavi vprašanje, kateri so njihovi celični substrati, ki vodijo v sprožitev apoptoze. V nekaterih celičnih modelih je sprožitev apoptoze odvisna le od katepsinov (Foghsgaard et al., 2001; Leist and Jäättelä, 2001b; Boya et al., 2003a; Cirman et al., 2004), v nekaterih pa je potrebna tudi aktivacija kaspaz (Faubion et al., 1999; Guicciardi et al., 2000). Katepsini lahko v rakastih celicah cepijo E-cadherin, celično adhezija molekulo, ki jo tudi cepijo kaspaze (Gocheva et al., 2006). Večina študij pa predlaga, da od katepsinov odvisna apoptoza poteka preko mitohondrija, temu pa sledi sprostitvev proteinov iz intermembranskega prostora v citosol (Guicciardi et al., 2000; Bidere et al., 2003; Boya et al., 2003a; Zhao et al., 2003; Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008). Pri poškodbi mitohondrijske membrane lahko pride do tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti, ki lahko še dodatno poškodujejo membrano lizosoma (Zhao et al., 2003). Sproščanje katepsinov v citosol lahko neposredno (Zhao et al., 2003) ali posredno vpliva na destabilizacijo mitohondrijske membrane (Stoka et al., 2001; Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008).

Inkubacija mitohondrijev s katepsinoma B in D je povzročila tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (Zhao et al., 2003), čeprav je inkubacija s samim katepsinom B sprožila le minimalno sproščanje citokroma c iz mitohondrijev (Guicciardi et al., 2000). Nasprotno pa je inkubacija mitohondrijev s katepsinom B v prisotnosti citosolnih ekstraktov sprožila večje koncentracije citokroma c iz mitohondrija. To je pokazalo, da obstaja en ali več citosolnih faktorjev, ki jih aktivira katepsin B (Guicciardi et al., 2000). Eden najverjetnejših kandidatov bi lahko bil citosolni član družine Bcl-2, za katere je znano, da so pomembni regulatorji apoptoze. Pokazano je bilo, da lahko lizosomski ekstrakti cepijo Bid v 15 kDa fragment, ki povzroči destabilizacijo mitohondrijske membrane in sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev (Stoka et al., 2001). Lizosomski encimi cepijo Bid za Arg<sup>65</sup>, kaspaza-8 za Asp<sup>59</sup>, grancim B pa za Asp<sup>75</sup>. Vsa tri cepitvena mesta pa se nahajajo na isti fleksibilni zanki (Stoka et al., 2001). Nadaljnje študije so še potrdile, da rekombinantni katepsini, med njimi katepsin B, K, L, H in S, ne pa katepsini D, C in X cepijo Bid za Arg<sup>65</sup>, z izjemo katepsina H, ki edini cepi za Arg<sup>71</sup> (Cirman et al., 2004). Pokazano je tudi bilo, da po

sprožitvi apoptoze z lizosomotropno snovjo LeuLeuOMe, katepsini cepijo Bid, ki se nato premesti na zunanjo mitohondrijsko membrano (Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008).

Poleg proteina Bid lahko lizosomski encimi cepijo in aktivirajo tudi Bax, ki je prav tako vključen v destabilizacijo mitohondrijske membrane. Pri apoptozi sproženi s stavrosporinom v človeških limfocitih je prišlo do sprostitve katepsinov v citosol in temu je sledila destabilizacija mitohondrijske membrane. Z uporabo siRNA tehnike so pokazali, da je katepsin D, ne pa katepsina B in L, sprožil aktivacijo Bax in njegovo premestitev na zunanjo mitohondrijsko membrano ter sprostitve AIF iz mitohondrijev in posledično apoptozo (Bidere et al., 2003).

Najnovejše študije pa kažejo, da lahko katepsini poleg cepitve proapoptotskega proteina Bid in Bax, vplivajo na destabilizacijo mitohondrijske membrane z razgraditvijo antiapoptotskih proteinov Bcl-2, Bcl-xL in Mcl-1 (Droga-Mazovec et al., 2008).

Zelo verjetno je, da katepsini ne sprožajo apoptozo po eni sami poti, ampak po številnih molekularnih mehanizmih in poteh s cepitvijo in aktivacijo različnih celičnih substratov. Prav zaradi tega ne moremo govoriti o splošnem modelu, saj so poti odvisne tudi od tipa celice in apoptotskega dražljaja (Turk et al., 2002a; Turk and Stoka, 2007).

## 1.4.2 Mehanizmi poškodbe lizosomske membrane

Predlaganih je veliko mehanizmov, ki vodijo k poškodbi lizosomov in sproščanju katepsinov v citosol (Slika 10). Natančni biokemijski mehanizmi ter signalne poti pa še vedno niso popolnoma razjasnjene. Prav tako ni znano tudi to, ali se po poškodbi lizosomske membrane vsi proteini sprostijo v citosol hkrati, ali je prehod encimov bolj selektiven (Kroemer and Jäättelä, 2005).

Eden od mehanizmov je ta, da destabilizacijo lizosomov povzroča znotrajcelični sfingozin. Večjo količino sfingozina so opazili pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$  (Kagedal et al., 2001b), temu pa je sledila destabilizacija lizosomov (Guicciardi et al., 2000). Sfingozin, ki se tvori iz ceramida se zaradi dolgega lipofilnega repa in polarne glave s skupino  $-NH_2$ , ki se v lizosomih protonira, kopiči v lizosomih in lahko deluje kot detergent (Kagedal et al., 2001b). Inkubacija Jurkat celic in J774 celic z nizkimi koncentracijami sfingozina, je vodila v delno poškodbo lizosomske membrane, ki ji je sledila destabilizacija mitohondrijske membrane in aktivacija kaspaz. Nasprotno pa so visoke koncentracije sfingozina povzročile močnejšo poškodbo lizosomov in posledično nekrozo, brez sodelovanja kaspaz (Kagedal et al., 2001b). Sfingozin je povzročil destabilizacijo lizosomske membrane tudi v primarnih mišjih hepatocitih (Werneburg et al., 2002). V celicah nastaja sfingozin pri procesiranju ceramida, ki je tudi vključen v destabilizacijo lizosomske membrane. Ceramid se tvori v lizosomih ob delovanju kisle sfingomielinaze. Pokazali so, da se lahko veže in aktivira katepsin D in ta vezava ceramida na katepsin D povzroči procesiranje ter aktivacijo prokatepsina D, ki je odgovoren za aktivacijo drugih lizosomskih proteinov (Heinrich et al., 2004).

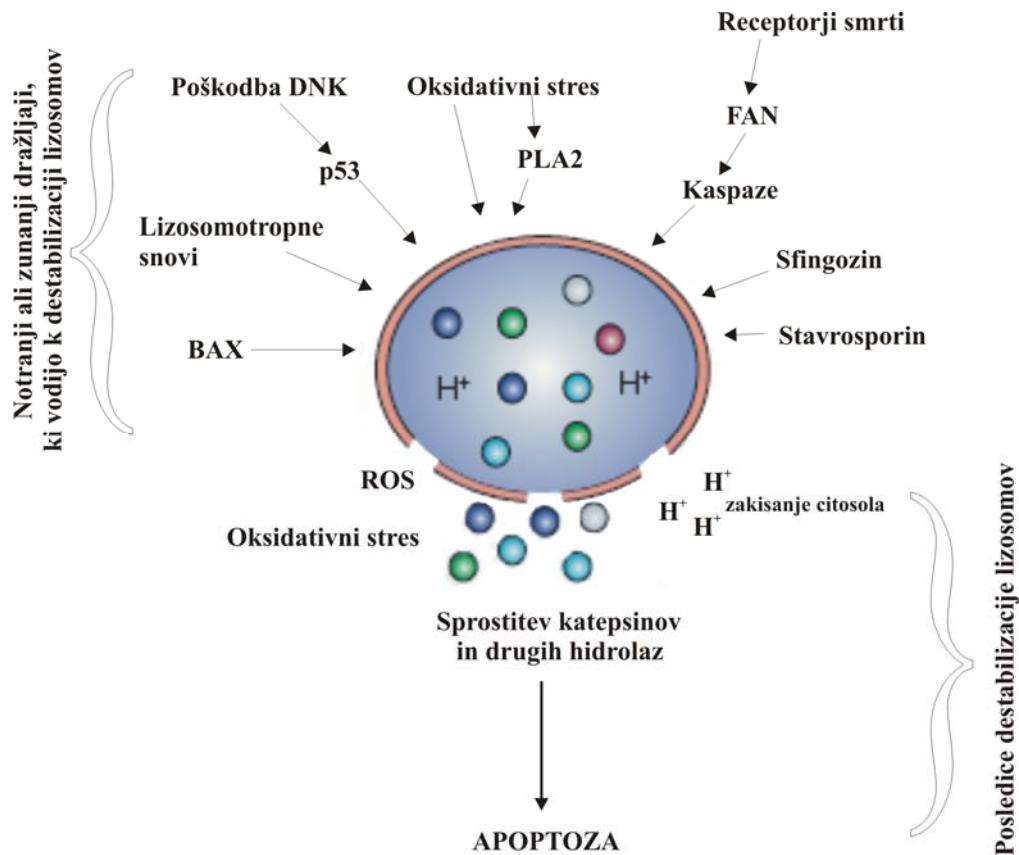
Eden možnih mehanizmov je tudi ta, da poškodbo lizosomske membrane sproži nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (Slika 9). Oksidativni stres skupaj z znotraj lizosomskim železom povzroči tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki oksidirajo membranske lipide in povzročijo destabilizacijo lizosomskih membran (Brunk et al., 2001; Blomgran et al., 2007). Veliko apoptotskih dražljajev, ki sprožijo destabilizacijo lizosomov, kot so TNF- $\alpha$  (Manna et al., 1998) in fotosenzitirajoče lizosomotropne kemikalije (Ferri and Kroemer, 2001), sproži tudi nastanek znotrajceličnega vodikovega peroksida. Znano je tudi, da nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti pri staranju sodeluje in pripomore k destabilizaciji lizosomov (Bahr and Bendiske, 2002). Tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti sproži destabilizacijo lizosomske membrane. V citosol se sprostijo lizosomski encimi, ki vplivajo na poškodbo mitohondrijske membrane in na ta način pripomorejo k tvorbi nastanka mitohondrijskih reaktivnih kisikovih zvrsti (Roberg et al., 1999; Guicciardi et al., 2000). Nastanek mitohondrijskih reaktivnih kisikovih zvrsti tako pripomore k še večji destabilizaciji lizosomske membrane (Zhao et al., 2003). Najnovejša odkritja o oksidativnem stresu pa kažejo, da izpostavitve celic nizkim koncentracijam  $H_2O_2$  povzroči poškodbo lizosomov posredno preko aktivacije fosfolipaze A2 (PLA2). Fosfolipaza A2 razgrajuje membranske fosfolipide in tako povzroča destabilizacijo lizosomov in mitohondrijev (Zhao et al., 2001). Aktivira se tudi med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$  (Jäättelä et al., 1995).

Zanimiva je tudi razlaga, ki pravi, da lahko proapoptotski proteini iz družine Bcl-2 tvorijo pore na lizosomski membrani na podoben način kot to naredijo na mitohondrijski membrani. Pokazali so, da se lahko Bid po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$  v podganjih hepatocitih premesti v lizosome in povzroči poškodbo membrane (Werneburg et al., 2004). V človeških hepatoblastomskih celicah pa je sprožitev apoptoze s prostimi maščobnimi kislinami povzročila premestitev proapoptotskega proteina Bax v lizosome ter njihovo destabilizacijo (Feldstein et al., 2004).

Poleg zunajceličnih dražljajev lahko tudi sami procesi znotraj lizosoma pripeljejo do destabilizacije

lizosomske membrane. Izguba proteina Hsp70, ki je stres-inducibilni šaperon in ima pomembne antiapoptotske funkcije, sproži spuščanje lizosomskih encimov v citosol in apoptozo, ki je od kaspaz neodvisna (Nylandsted et al., 2002). Pokazali so tudi, da lahko odotnost katepsina B v hepatocitih zmanjša obsežnost poškodbe lizosomskih membran med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ , kar kaže na možno vpletenost katepsinov tudi v procesu destabilizacije lizosomov (Baskin-Bey et al., 2005). Antihimotripsinu podoben serpin, serinski proteazni inhibitor 2A (Spi2A), ki inhibira katepsin B prav tako zmanjša destabilizacijo lizosomov (Liu et al., 2003).

Poškodbo lizosomov lahko *in vitro* sprožijo tudi lizosomotropne snovi, kot sta MSDH (O-metil-serin dodecilamid hidroklorid) ter L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe) (Thiele and Lipsky, 1992; Uchimoto et al., 1999; Li et al., 2000).



Slika 10. *Mehanizmi poškodbe lizosomske membrane.* Natančni mehanizmi poškodbe lizosomske membrane še niso povsem razjasnjeni, k destabilizaciji lizosomov pa lahko vodijo tako notranji (poškodba DNK, oksidativni stres, sfingozin, proteini iz družine Bcl-2, kaspaze, idr.) kot tudi zunanji (receptorji smrti, lizosomotropne snovi, stavrosporin, idr.) dražljaji (povzeto po Kroemer and Jäätelä, 2005; Boya and Kroemer, 2008).

## 2 Namen dela

Vedno več je dokazov, ki potrjujejo, da v procesu apoptoze poleg kaspaz sodelujejo tudi cisteinske proteaze, katepsini. Natančni mehanizmi sprožitve celične smrti zaradi destabilizacije lizosomskih membran še vedno niso popolnoma razjasnjeni. Zato je bil naš prvi namen dela pojasniti vlogo cisteinskih katepsinov med apoptozo sproženo z neposredno destabilizacijo lizosomov z lizosomotropno kemikalijo LeuLeuOMe v človeški celični liniji HaCaT ter poiskati substrate cisteinskih katepsinov v tem modelu celične smrti.

Do destabilizacije lizosomske membrane in posledičnega iztekanja katepsinov v citosol prihaja tudi po aktivaciji receptorjev smrti. Nekateri avtorji trdijo, da je pri apoptozi sproženi preko zunanje poti, destabilizacija lizosomov zgodnji dogodek. Naše zadnje študije na mišjih primarnih dermalnih fibroblastih pa kažejo, da je po aktivaciji receptorja Fas, destabilizacija lizosomov lahko sekundarni dogodek, oziroma se zgodi po poškodbi mitohondrijev. Tako je bil naš naslednji namen dela natančneje raziskati mehanizem sprožitve destabilizacije lizosomske membrane pri apoptozi, sproženi z fiziološkim sprožilcem apoptoze TNF- $\alpha$ , na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B oziroma katepsin L. Prav tako je bil naš namen tudi pojasniti vlogo in pomen katepsina B ali L v tem modelu celične smrti.



### 3 Materiali in metode

#### 3.1 Metode dela s celicami

##### 3.1.1 Gojenje celic

Človeško celično linijo keratinocitov HaCaT (ATCC) in primarne mišje embrionalne fibroblaste divjega tipa in tiste z izbitim genom za katepsina B ali L (dr. Christoph Peters) smo gojili v inkubatorju v kontrolirani atmosferi (37°C, 5-odstotni delež CO<sub>2</sub> in atmosfera nasičena z vodno paro). Za celice smo uporabljali medij DMEM (CAMBREX Bio Science, Gibco), obogaten z 20-odstotnim FBS (Hyclone), za primarne mišje embrionalne fibroblaste divjega tipa in tiste z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L, ter obogaten z 10-odstotnim FBS za celice HaCaT, penicilinom (5 U/0,5 l) in streptomycinom (5 µg/0,5 l) (t.j. kDMEM). Vsi eksperimenti z mišjimi embrionalnimi fibroblasti, tako divjega tipa kot tistimi z izbitim genom za katepsin B ali L, so bili narejeni v pasažah od 2 do 4.

##### 3.1.2 Tripsinizacija in precepljanje celic

Celicam smo odstranili medij, jih sprali z 10 ml PBS (145 mM NaCl, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, pH = 7,2), jim nato dodali 1 ml raztopine TrypLE Select (Gibco) ter pustili v CO<sub>2</sub> inkubatorju pri 37°C, dokler se celice niso odlepili od površine. Odlepljenim celicam smo dodali kDMEM v razmerju 1:10 in razdelili različno število celic v različne plošče, odvisno od eksperimenta, ki smo ga izvajali.

##### 3.1.3 Zamrzovanje celic

Celice s konfluentne 10 cm plošče (TRP, Corning) smo tripsinizirali in prešteli, nato smo jih centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm, supernatant odstranili, celice pa resuspendirali v ohlajenem zamrzovalnem mediju (10 % DMSO, 40 % FCS, 50 % DMEM) in prenesli 10<sup>7</sup> celic/ml v zamrzovalne vial. Preden smo celice prenesli v tekoči dušik smo vial s celicami shranili čez noč na -70°C.

##### 3.1.4 Odmrzovanje celic

Celice iz tekočega dušika smo hitro odtajali v vodni kopeli pri 37 °C. Prenesli smo jih v 10 ml kDMEM, centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm, medij odstranili, celice pa resuspendirali v novem kDMEM v razmerju 1:10 ter prenesli v 10 cm ploščo.

#### 3.2 Sprožitev apoptoze z destabilizacijo lizosomov v človeški celični liniji HaCaT z lizosomotropno snovjo L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe)

##### 3.2.1 Določitev optimalne koncentracije LeuLeuOMe

Človeško celično linijo HaCaT smo gojili v mediju DMEM z dodanim 10-odstotnim FBS pod standardnimi pogoji. Celice smo nacepili v plošče s 6 luknjami, tako, da je bilo v vsaki luknji 1 x 10<sup>6</sup> celic in inkubirali preko noči oziroma vsaj 16 ur v inkubatorju s CO<sub>2</sub> pri 37°C. Da bi določili optimalno koncentracijo LeuLeuOMe, smo naslednji dan po nacepiti celicam dodali različne koncentracije (0,3-3 mM) LeuLeuOMe ter inkubirali 16 ur. Po 16 urah smo pripravili popolni celični lizat in izmerili aktivnost kaspaze-3.

### 3.2.2 Sprožitiv apoptoze z LeuLeuOMe

Celice ( $1 \times 10^6$ ) smo nacepili v 10 cm plošče in jih gojili preko noči v inkubatorju  $\text{CO}_2$  pri  $37^\circ\text{C}$ . Naslednji dan smo celicam dodali inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d (končna koncentracija  $20 \mu\text{M}$ ), inhibitor kaspaz z-VAD-fmk (končna koncentracija  $15 \mu\text{M}$ ), inhibitor kalpainov AC27P (končna koncentracija  $50 \mu\text{M}$ ) in inhibitor katepsina D pepstatin A (končna koncentracija  $50 \mu\text{M}$ ). Celice smo z inhibitorji E-64d, z-VAD-fmk in pepstatinom A, inkubirali 4 ure, z AC27P pa pol ure pred dodatkom LeuLeuOMe. Po dodatku  $1 \text{ mM}$  LeuLeuOMe smo jih inkubirali še 16 ur v inkubatorju s  $\text{CO}_2$  pri  $37^\circ\text{C}$ . Po 16 urah smo celice tripsinizirali, dvakrat sprali s pufrom PBS ter pripravili popolne celične lizate za merjenje aktivnosti kaspaze-3 ter imunodetekcijo proteina Bid, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 in PARP ter citosolne lizate za imunodetekcijo citokroma c in katepsina L. Prav tako smo v vzorcih merili delež apoptotskih celic s pretočno citometrijo ter preverili delež celic s poškodovanimi mitohondriji in lizosomi.

### 3.2.3 Določanje deleža apoptotskih celic z metodo pretočne citometrije

Delež zgodnje in pozno apoptotskih celic lahko zaznamo z uporabo Annexin-V-PE in 7-AAD. Annexin-V, na katerega je vezan fikoeritrin (Annexin-V-PE) nam omogoča določitev deleža zgodnje-apoptotskih celic. Annexin-V-PE se veže na fosfatidilserin, ki se na zunanjo stran membrane izpostavi med apoptozo. Kasneje med apoptozo prihaja tudi do kondenzacije in fragmentacije DNK, tako nam uporaba 7-AAD, ki se veže na DNK, omogoča določitev deleža pozno-apoptotskih oziroma nekrotskih celic.

Celice smo tripsinizirali in centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm. Medij smo odstranili in celice resuspendirali v 1 ml pufru PBS, jih prešteli ter ponovno centrifugirali (1300 rpm, 5 min). Celice smo nato še enkrat sprali s 5 ml pufru PBS ter jih resuspendirali v pufru za vezavo konjugiranega aneksina V-PE (Beckton Dickinson) ( $10^6$  celic/ml). V epruveto namenjeno za pretočno citometrijo smo prenesli toliko celic, da je bilo njihovo končno število  $10^5$  celic/ml, dodali  $5 \mu\text{l}$  konjugiranega aneksina V-PE (Beckton Dickinson) in  $5 \mu\text{l}$  7-AAD (Beckton Dickinson) ter inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi. Po 15 minutah smo vzorcu dodali še  $400 \mu\text{l}$  pufru za vezavo konjugiranega annexina V-PE ter pomerili fluorescenco označenega vzorca z napravo za pretočno citometrijo FACScalibur cytometer (Beckton Dickinson) in ustreznim programom (CellQuest software).

### 3.2.4 Merjenje aktivnosti kaspaze-3

V mikrotitrno črno ploščo (Greiner) smo nanесли ustrezen volumen vzorca tako, da je bil končni delež proteinov  $50 \mu\text{g}$ , ter dopolnili z  $\text{dH}_2\text{O}$  tako, da je bil končni volumen v vseh luknjicah  $40 \mu\text{l}$ . Nato smo dodali še  $50 \mu\text{l}$  2-kratnega kaspaznega pufru ( $100 \text{ mM}$  HEPES,  $200 \text{ mM}$  NaCl,  $0,2$ -odstotni (w/v) CHAPS,  $20$ -odstotna (w/v) saharoza,  $2 \text{ mM}$  EDTA,  $20 \text{ mM}$  DTT,  $\text{pH} = 7,4$ ) ter vzorce inkubirali pri  $37^\circ\text{C}$  10 minut. Po končani inkubaciji smo dodali  $10 \mu\text{l}$  substrata Ac-DEVD-AFC (Bachem) tako, da je bila njegova končna koncentracija  $100 \mu\text{M}$ . Fluorescenco smo merili pri valovni dolžini vzbujanja  $400 \text{ nm}$  ter valovni dolžini emisije  $505 \text{ nm}$ . Rezultati so podani kot sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon).

### 3.2.5 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji

Delež celic z poškodovanimi mitohondriji smo določili z uporabo kemikalije MitoTracker CMX-Ros. Kemikalija ni fluorescentna, fluorescira pa v rdečem območju, ko se oksidira, oziroma, ko vstopi v metabolno aktivne mitohondrije. Kopičenje barvila v mitohondrijih je tako odvisno od membranskega potenciala. Ob padcu membranskega potenciala, torej ob poškodbi membrane mitohondrija se v mitohondrijih akumulira manj barvila in celice kažejo zmanjšano intenziteto rdeče fluorescence. Celice smo tripsinizirali in odcentrifugirali 5 minut pri 1300 rpm. Medij smo odstranili in celice resuspendirali v 1 ml pufru PBS, jih prešteli ter ponovno centrifugirali (1300 rpm, 5 min). Celice smo nato še enkrat sprali s 5 ml pufru PBS ter jih resuspendirali ( $10^6$  celic/ml) v pufru DMEM, ki smo mu dodali toliko kemikalije MitoTracker CMX-Ros, da je bila njegova končna koncentracija  $30 \text{ nM}$ . Celice smo v tem mediju inkubirali 30 minut, nato smo jih odcentrifugirali 5 minut pri 1300 rpm in resuspendirali v 1 ml pufru PBS. Rdečo fluorescenco 5000 celic smo detektirali z uporabo pretočnega citometra in filtra FL3.

### 3.2.6 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi

Delež celic HaCaT s poškodovanimi lizosomi smo merili z uporabo barvila LysoTracker DND-26. Kemikalija se kopiči v kislih organelih in fluorescira zeleno. Pri celicah s poškodovanimi lizosomi opazimo

manjšo intenziteto zelene barve, ker pride do manjše količine nakopičenega barvila LysoTracker DND-26 v kisljih organelih. Celice smo tripsinizirali in odcentrifugirali 5 minut pri 1300 rpm. Medij smo odstranili in celice resuspendirali v 1 ml pufru PBS, jih prešteli ter ponovno centrifugirali (1300 rpm, 5 min). Celice smo nato še enkrat sprali s 5 ml pufru PBS ter jih resuspendirali ( $10^6$  celic/ml) v pufru DMEM, ki smo mu dodali toliko kemikalije LysoTracker DND-26, da je bila njegova končna koncentracija 35 nM. Celice smo v tem mediju inkubirali 5 minut, nato smo jih odcentrifugirali 5 minut pri 1300 rpm in resuspendirali v 1 ml pufru PBS. Zeleno fluorescenco 5000 celic smo detektirali z uporabo pretočnega citometra in filtra FL1 (Ivanova et al., 2008).

### 3.2.7 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom RIPA

Medij in tripsinizirane celice smo prenesli v centrifugirko in odcentrifugirali (3000 rpm, 5 min). Medij smo odstranili ter celice dvakrat sprali s hladnim pufrom PBS. Celice smo nato resuspendirali v 50  $\mu$ l pufru RIPA (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0,1-odstotni (w/v) NaDS, 1-odstotni (v/v) NP-40, 0,5-odstotna (w/v) deoksiholna kislina 1 mM EDTA) ter inkubirali na ledu 10 minut. Po desetih minutah smo celice centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm in 4°C, nato pa supernatant prenesli v svežo epruveto Eppendorf ter shranili na -70 °C oziroma takoj uporabili. Tako pripravljene vzorce smo uporabili za merjenje aktivnosti kaspaze-3 ter imunodetekcijo proteinov Bid, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 in PARP.

### 3.2.8 Priprava citosolnega lizata z digitoninom

Celice smo najprej tripsinizirali, jih prenesli v centrifugirko in odcentrifugirali pri 3000 rpm, in 4°C, 5 min. Celice smo dvakrat sprali s hladnim pufrom PBS in jih resuspendirali v 200  $\mu$ l hladnega pufru za ekstrakcijo (50  $\mu$ g/ml digitonin, 250 mM saharoza, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH = 7,5), ki smo mu dodali mešanico inhibitorjev proteaz inkubirali v razmerju 1:1000 (Sigma) na ledu 10 minut in vsako minuto za 5 sekund vorteksirali. Po kratkem centrifugiranju (1 min, 14000 rpm, 4°C) smo supernatant odstranili in ga prenesli v svežo epruveto Eppendorf ter jo shranili pri -70 °C (Ivanova et al., 2008). Te vzorce smo uporabili za imunodetekcijo citokroma c in katepsina L.

### 3.2.9 Določanje koncentracije proteinov v vzorcu

Vsebnost proteinov v celičnih lizatih smo določili z metodo po Bradfordu. Za izdelavo umeritvene krivulje smo zmešali 160  $\mu$ l BSA različnih koncentracij (0, 2, 6, 10, 14, 16, 20 in 25 mg proteina na ml vzorca) s 40  $\mu$ l reagenta za določanje koncentracije proteinov (BioRad), spektrofotometrično določili količino nastalega barvnega produkta pri 595 nm ter narisali umeritveno krivuljo (odvisnost  $A_{595}$  od količine proteina v vzorcu). Vzorce smo redčili v razmerju 1:100 – 1:1000 ter 160  $\mu$ l redčenega vzorca zmešali s 40  $\mu$ l reagenta BioRad. Poskus smo izvedli na ploščah s 96 luknjicami ter vrednosti absorbance odčitali s čitalcem mikrotitrskih plošč (Safire, Tecan). Koncentracijo proteinov v vzorcu smo odčitali iz umeritvene krivulje.

### 3.2.10 NaDS poliakrilamidna elektroforeza (NaDS PAGE)

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) smo uporabljali pod redukcijskimi pogoji. S to metodo smo ločevali proteine celičnih lizatov, ki smo jih nato s prenosom Western prenesli na membrano za imunološko analizo. Elektroforezo smo standardno naredili na 15-odstotnih poliakrilamidnih gelih na aparaturi P8DS Penguin<sup>TM</sup> (Owl Separation Systems, ZDA). Za kontrolo velikosti smo nanесли proteinske standarde (MBI Fermentas, Litva). Pred nanosom smo vzorce z nanašalnim pufrom (100 mM TRIS, 200 mM DTT, 4-odstotni (w/v) NaDS, 0,2-odstotni bromfenol modro, 20-odstotni (v/v) glicerol) segrevali 5 min pri 100°C. Elektroforeza je potekala pri stalnem toku 30 mA/gel, dokler barvilo iz nanašalnega pufru ni pripotovalo do spodnjega roba gelov. Razviti gel smo uporabili za prenos Western.

### 3.2.11 Prenos Western

Po končani gelski elektroforezi smo gel s proteini, nitrocelulozno membrano ter filterski papir enake velikosti kot gel pomočili v pufer za prenašanje (25 mM TRIS, 8 mM glicin, 0,04-odstotni (w/v) NaDS, 20-odstotni (v/v) metanol). V kaseto za prenos Western smo položili peno, filterski papir, gel, membrano, filterski papir ter ponovno peno. Kaseto smo vstavili v banjico s pufrom za prenašanje ter pri konstantnem toku 200 mA prenašali proteine dve uri. Po končanem prenosu smo membrano s proteini uporabili za imunodetekcijo.

### 3.2.12 Imunodetekcija

Po končanem prenosu smo nezasedena vezavna mesta na nitrocelulozni membrani blokirali s 45-minutno inkubacijo v 5-odstotnem posnetem mleku v prahu v pufru PBS. Membrano smo nato sprali s pufrom PBS-T (v pufer PBS dodamo toliko Tweena 20 (Serva), da je njegov končni delež 0,5-odstoten (v/v)) in jo inkubirali s primarnimi protitelesi preko noči pri 4°C ali 2 h na sobni temperaturi. V pufru PBS-T smo redčili vsa primarna zajčja in mišja protitelesa (actin 1/1000 (Sigma), Bid 1/500 (R&D System), Bcl-2 1/500 (Santa Cruz), Bcl-xL 1/500 (Santa Cruz), katepsin L 1/250 (dr. Nataša Kopitar-Jerala), citokrom c 1/1000 (BD Pharmingen) in PARP 1/500). Po inkubaciji smo štirikrat spirali membrano s pufrom PBS-T, vsakič po 10 min, nato je sledila 1-urna inkubacija v sekundarnih protitelesih, konjugiranih s hrenovo peroksidazo. Sekundarna protitelesa smo redčili v pufru PBS-T, ki je vseboval 5-odstotni delež posnetega mleka (antizajčja, antimišja in antikožja protitelesa smo redčili 1/3000 (Sigma, Dakko)). Po inkubaciji smo membrano sprali trikrat po petnajst minut s pufrom PBS-T. Proteine na membrani smo detektirali na podlagi kemoluminescence s pomočjo reagenta ECL (Amersham Pharmacia Biotech) po navodilih proizvajalca.

## 3.3 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali L

### 3.3.1 Priprava primarnih mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa

Ves postopek smo delali sterilno v laminarju. Škarje, pincete, nože in erlenmajerice z magnetno palčko smo predhodno sterilizirali. Miši, ki so bile breje 12,5 do 13,5 dni smo uspavali s CO<sub>2</sub>. S sterilnimi škarjami smo prerezali trebušno votlino ter iz maternice odvzeli zarodke in jih prenesli v sterilni pufer PBS. Srce in jetra (rdeči organi) ter glavo smo odstranili s sterilno pinceto. Po dva embria smo razrezali in ju dali v sterilno erlenmajerico, ki je vsebovala steklene kroglice, 10 ml 0,25-odstotnega tripsina in magnetno palčko. Embrije smo tako tripsinizirali na magnetnem mešalu 15 minut pri 37°C. Tripsiniziranje smo ustavili z dodatkom 10 ml medija kDMEM ter vsebino erlenmajerice prenesli v svežo 50-mililitrsko centrifugirko ter centrifugirali 5 minut pri 1500 rpm. Po centrifugiranju smo medij odstranili, usedlini (celicam) dodali 10 ml svežega medija kDMEM ter jih prenesli v svežo 10-centimetrsko ploščo. Celice smo gojili preko noči v inkubatorju s CO<sub>2</sub> pri 37°C. Naslednji dan smo celicam zamenjali medij in počakali toliko dni, dokler 10-centimetrska plošča ni dosegla 90-odstotne konfluentnosti. Z 90-odstotkov konfluentne plošče smo celice precepili na 15-centimetrsko ploščo. Iz konfluentne 15-centimetrske plošče smo celice zamrzili v štiri ampule za zamrzovanje.

### 3.3.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX

Mišje embrionalne fibroblaste divjega tipa in z izbitim genom za katepsine B in L smo nacepili v 6 cm plošče (0,6 x 10<sup>6</sup>/ml) ter inkubirali preko noči oziroma vsaj 16 ur v inkubatorju CO<sub>2</sub> pri 37°C. Naslednji dan smo celicam dodali 100 ng/ml TNF $\alpha$  (dr. Peter Vandenabeele) in 1  $\mu$ g/ml CHX (Sigma) ter inkubirali 6, 8, 10, 12 in 14 ur. Po različnih časih smo pripravili popolne celične lizate za meritev kaspazne aktivnosti in imunodetekcijo proteina Bid ter pripravili citosolni lizat z digitoninom za imunodetekcijo citokroma c. Da bi preverili, kako vpliva izbitje genov, ki so pomembni med apoptozo, na destabilizacijo mitohondrijev in lizosomov smo vzporedno pripravili tudi celice, ki smo jih po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX inkubirali z MitoTracker Red CMX-Ros (Molecular Probes) in kemikalijo akridin oranž AO (Sigma) ter z uporabo pretočne citometrije ugotavljali odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji in lizosomi. Prav tako smo v vzorcih merili delež apoptotskih celic s pretočno citometrijo ter spremljali nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti z barvilom CM-H2DCFDA (Molecular Probes). Delež apoptotskih celic, poškodbo lizosomske membrane, poškodbo mitohondrijske membrane smo spremljali tudi v prisotnosti odstranjevalcev reaktivnih kisikovih zvrsti. Uporabili smo odstranjevalec reaktivnih kisikovih zvrsti BHA (butiliran hidroksianizol) (Sigma) pri koncentraciji 300  $\mu$ M, odstranjevalec TEMPOL (Sigma) pri koncentraciji 3 mM in t.i. kelator železovih ionov, desferrioxamine ali DFO (Sigma) (snov pridobljena iz streptomycet) pri koncentraciji 2 mM. Mišje embrionalne fibroblaste smo v prisotnosti odstranjevalcev inkubirali dve uri in jim po dveh urah dodali TNF- $\alpha$ /CHX. Inkubacija celic z odstranjevalci reaktivnih kisikovih zvrsti pri omenjenih koncentracijah ni bila toksična za naše celice, kar smo preverili z odstotkom zgodnje/pozno apoptotskih celic.

### 3.3.3 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi

Delež celic mišjih embrionalnih fibroblastov s poškodovanimi lizosomi smo določili z uporabo kemikalije akridin oranž (A.O.). Akridin oranž je šibka baza ( $pK_a = 10,3$ ), ki v kislih organelih v nabiti obliki ( $AOH^+$ ) sveti rdeče. Celice, ki imajo poškodovane lizosome, imajo manjšo količino nakopičene kemikalije A.O. in zato nižjo intenziteto rdeče fluorescence. Vzorce smo pripravili podobno kot pri določanju deleža celic s poškodovanimi mitohondriji, le da smo celice inkubirali 15 minut v mediju DMEM, ki je vseboval 5  $\mu\text{g/ml}$  A.O. Celice smo nato odcentrifugirali 5 minut pri 1300 rpm in resuspendirali v 1 ml pufru PBS. Rdečo fluorescenco 5000 celic smo detektirali z uporabo pretočnega citometra in filtra FL3 (Ivanova et al., 2008).

### 3.3.4 Ocenitev znotrajcelične oksidacije oziroma spremljanje nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti

Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti oziroma znotrajcelično oksidacijo smo ocenili z uporabo CM-H<sub>2</sub>DCFDA (2'-7'-diklorodihidrofluoroscein diacetat). CM-H<sub>2</sub>DCFDA prehaja v celico s pasivnim transportom, kjer se deacetilira do CM-DCFH<sub>2</sub> (2'-7'-diklorodihidrofluoroscein), ki je nefluorescentna molekula. Peroksidaze, citokrom c in Fe<sup>2+</sup> pa jo v prisotnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidirajo v zeleno fluorescirajočo molekulo DCF (2'-7'-diklorofluoroscein) (Curtin et al., 2002). Barvilo smo celicam dodali 30 min pred dodatkom TNF- $\alpha$ /CHX ter eno uro pred zaključkom poskusa, tako da je bila njegova koncentracija 5  $\mu\text{M}$ . Po koncu poskusa smo celice tripsinizirali in centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm. Medij smo odstranili in celice resuspendirali v 1 ml PBS. Zeleno fluorescenco 5000 celic smo detektirali z uporabo pretočnega citometra in filtra FL1.



## 4 Rezultati

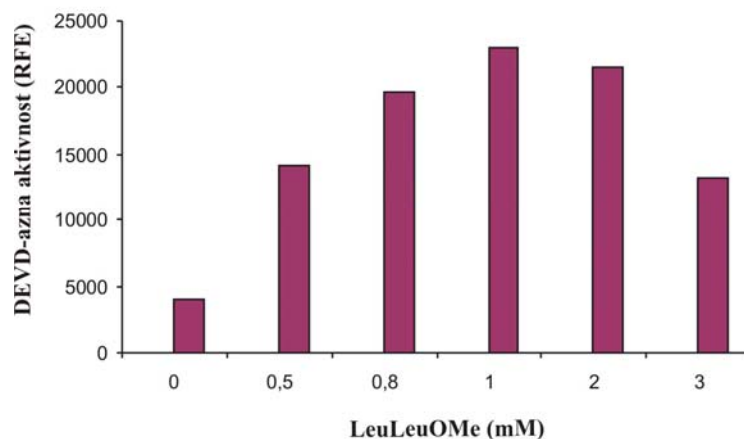
### 4.1 Sprožitev apoptoze z lizosomotropno snovjo L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe) v človeški celični liniji HaCaT

Pokazano je bilo, da LeuLeuOMe povzroči za apoptozo značilne morfološke biokemijske spremembe celice (Thiele and Lipsky, 1992; Uschimoto et al., 1999; Kobayashi et al., 2000; Cirman et al., 2004). Apoptozo sproženo z LeuLeuOMe smo proučevali na človeški celični liniji HaCaT.

#### 4.1.1 Sprožitev apoptoze v človeški celični liniji HaCaT

##### 4.1.1.1 Določitev optimalne koncentracije LeuLeuOMe

Najprej smo na celicah HaCaT izvedli optimizacijo z različnimi koncentracijami LeuLeuOMe. Optimizacija LeuLeuOMe je potrebna, saj je znano, da lahko določena kemikalija pri visokih koncentracijah povzroči nekrozo, pri nižjih koncentracijah pa celice umirajo z apoptozo (Li et al., 2000). Celice HaCaT smo tako inkubirali z naraščajočimi koncentracijami LeuLeuOMe in po 16 urah pripravili popolne celične lizate in izmerili DEVD-azno aktivnost. Za nadaljnje delo smo izbrali koncentracijo 1 mM, ker je bila pri tej koncentraciji DEVD-azna aktivnost najvišja (Slika 11).

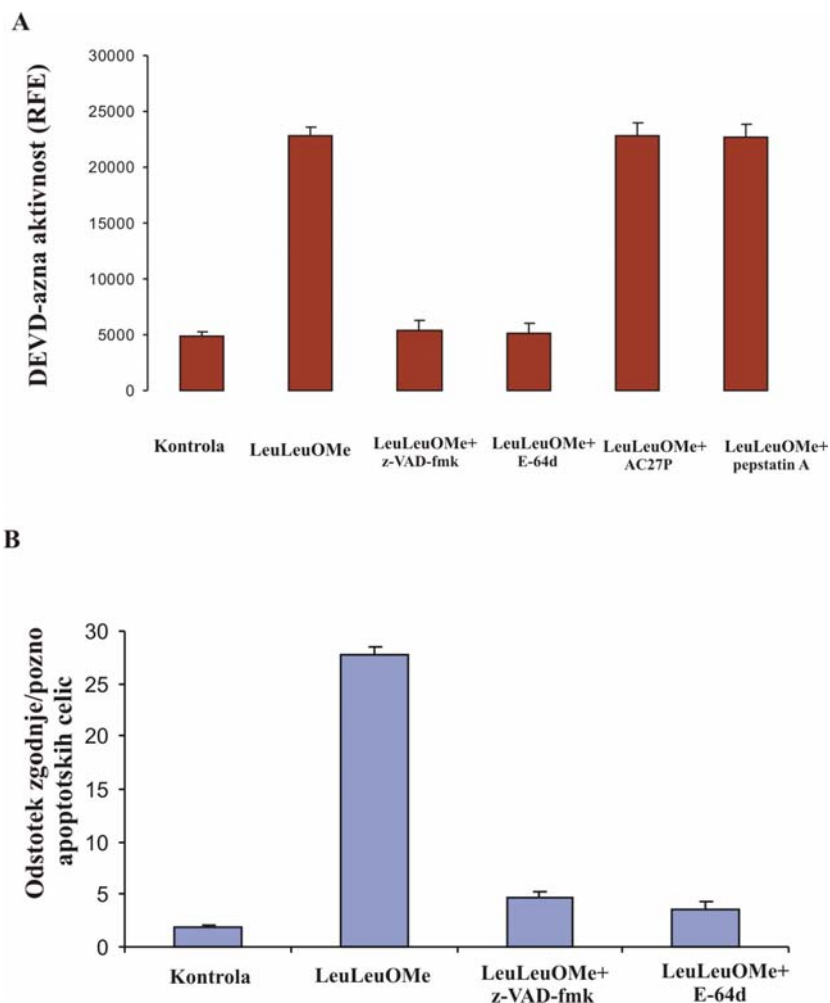


Slika 11: DEVD-azna aktivnost v popolnih celičnih lizatih celic HaCaT. DEVD-azna aktivnost se je z naraščajočo koncentracijo LeuLeuOMe višala in dosegla najvišjo vrednost pri 1 mM LeuLeuOMe. Pri višjih koncentracijah LeuLeuOMe pa je bila opažena nižja aktivnost kaspaz.

##### 4.1.1.2 Delež apoptotskih celic in DEVD-azna aktivnost po sprožitev apoptoze z LeuLeuOMe

Celice HaCaT smo inkubirali 16 ur z 1 mM LeuLeuOMe v prisotnosti različnih inhibitorjev z namenom, da bi ugotovili ali so cisteinski katepsini odgovorni za aktivacijo kaspaze-3 pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe. Uporabili smo inhibitor kaspaz z-VAD-fmk, inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d in inhibitor katepsina D pepstatin A. Ker lahko inhibitor E-64d inhibira tudi kalpaine, smo celice inkubirali še z inhibitorjem kalpainov AC27P. Po 16 urah inkubacije smo pripravili popolne celične lizate in izmerili DEVD-azno aktivnost ter celice označili z Annexin V-PE in 7AAD ter fluorescenco pomerili s pretočnim citometrom. Kot vidimo na sliki 12 A, DEVD-azne aktivnosti nista preprečila inhibitor kalpainov in inhibitor katepsina D. DEVD-azno aktivnost pa sta preprečila inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d ter inhibitor kaspaz z-VAD-fmk (Slika 12 A). Ker E-64d ne inhibira kaspaz, smo sklepali, da so za aktivacijo kaspaz odgovorni cisteinski katepsini, ne pa kalpainsi ali katepsin D. Tudi odstotek zgodnje/pozno

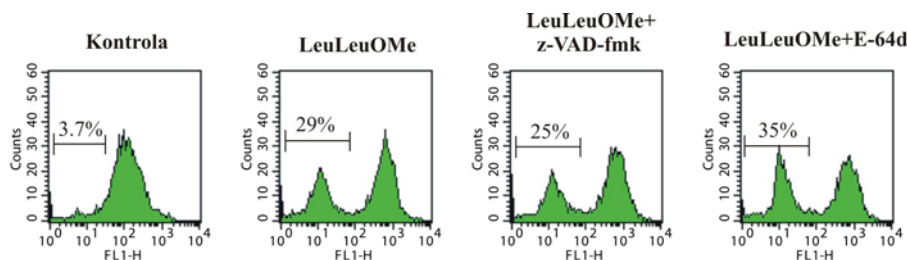
apoptotskih celic je bil bistveno manjši v prisotnosti inhibitorja E-64d, v primerjavi z odstotkom zgodnje/pozno apoptotskih celic inkubiranih samo z 1 mM LeuLeuOMe (Slika 12 B).



Slika 12: DEVD-azna aktivnost in odstotek Annexin V-PE/7AAD pozitivnih celic v celicah HaCaT. (A) Inhibitorja E-64d in z-VAD-fmk sta preprečila DEVD-azno aktivnost, AC275 in pepstatin A pa na aktivnost kaspaz nista vplivala. (B) Največ zgodnje/pozno apoptotskih celic opazimo pri celicah inkubiranih z LeuLeuOMe. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v celicah, katerim smo dodali inhibitorja E-64d in z-VAD-fmk pa je primerljiv s kontrolo.

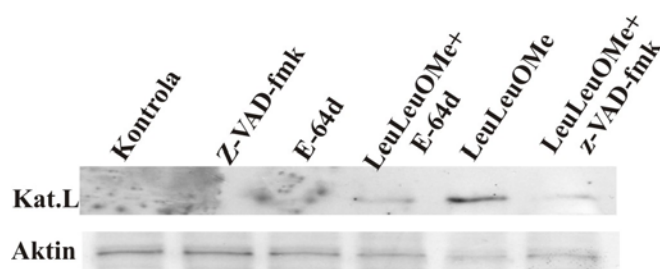
#### 4.1.1.3 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi in imunodetekcija katepsina L

Pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe pride najprej do poškodbe lizosomske membrane, kar povzroči iztekanje katepsinov v citosol. Za določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi smo uporabili barvilo LysoTracker DND-26. Barvilo LysoTracker DND-26 se kopiči v nepoškodovanih lizosomih in sveti zeleno, če pa so lizosomi poškodovani, opazimo nižjo intenziteto zelene barve. Tako smo opazili nižjo intenziteto zelene fluorescence v celicah, ki smo jim dodali LeuLeuOMe in pa v celicah, ki smo jim pred dodatkom LeuLeuOMe dodali inhibitorja, E-64d in z-VAD-fmk (Slika 13). To potrjuje predhodne študije, ki kažejo, da LeuLeuOMe dejansko sproži puščanje lizosomov.



Slika 13: Odstotek celic HaCaT s poškodovanimi lizosomi po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe. Do poškodbe lizosomov oz. nižje intenzitete zelene barve je prišlo v celicah inkubiranih z LeuLeuOMe in v celicah, katerim smo pred dodatkom LeuLeuOMe dodali tudi inhibitorja z-VAD-fmk ali E-64d.

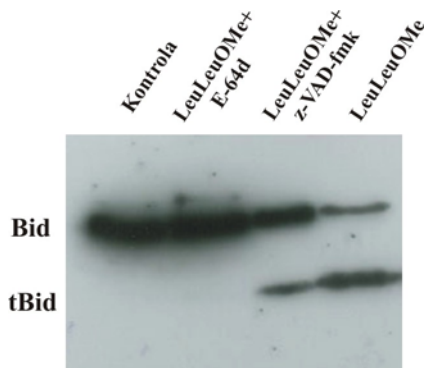
Da bi potrdili, da apoptoza sprožena z LeuLeuOMe povzroči iztekanje katepsinov v citosol, smo po 16 urni inkubaciji pripravili še citosolne lizate in naredili imunodetekcijo katepsina L. Iz slike 14 je razvidno, da je prišlo do iztekanja katepsina L v citosol v celicah katerim smo dodali samo LeuLeuOMe in v celicah, katerim smo pred dodatkom LeuLeuOMe dodali tudi inhibitorja E-64d ali z-VAD-fmk (Slika 14), kar je skladno z drugimi ugotovitvami.



Slika 14: Imunodetekcija katepsina L med apoptozo sproženo z LeuLeuOMe. Do sprostitve katepsina L v citosol je prišlo po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe. Niti inhibitor E-64d niti z-VAD-fmk tega puščanja nista preprečila.

#### 4.1.1.4 Imunodetekcija proapoptotske molekule Bid in določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji

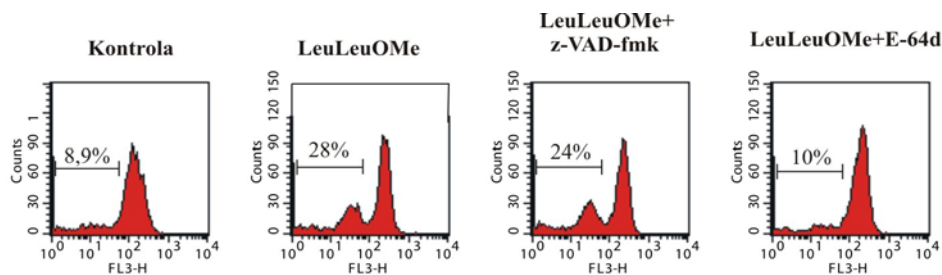
*In vitro* in na celični liniji HeLa je bilo pokazano, da je proapoptotski protein Bid substrat cisteinskih katepsinov pri sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe (Stoka et al., 2001; Cirman et al. 2004). Zanimalo nas je, ali se tudi v celicah HaCaT, po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe protein Bid cepi v 15 kDa velik fragment. Po 16 urni inkubaciji z LeuLeuOMe smo pripravili popolne celične lizate in naredili imunodetekcijo cepljene oblike molekule Bid. Kot vidimo na sliki 15, pride do cepitve molekule Bid pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe. E-64d pa to cepitev prepreči (Slika 15), kar kaže na to, da so za cepitev odgovorni cisteinski katepsini.



Slika 15: Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid med apoptozo sproženo z LeuLeuOMe v celicah HaCaT. Po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe pride do cepitve proteina Bid v 15 kDa fragment. Prisotnost inhibitorja E-64d to cepitev popolnoma prepreči, z-VAD-fmk pa to cepitev prepreči le delno.

Pokazali smo, da med apoptozo sproženo z LeuLeuOMe pride do poškodbe lizosomske membrane, iztekanja katepsinov v citosol ter cepitve proapoptotske molekule Bid. Ker je cepitev Bid-a povezana z

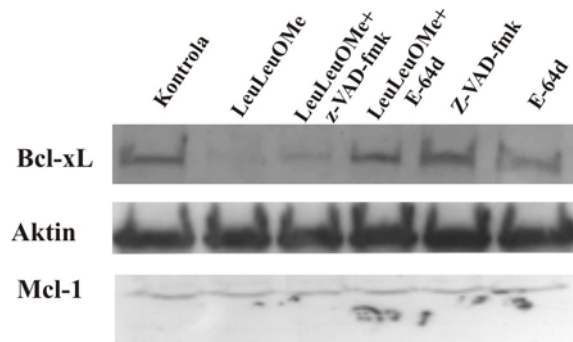
destabilizacijo mitohondrijev, nas je nadalje zanimalo, če temu sledi destabilizacija mitohondrijev. Zato smo celice po 16 urni inkubaciji z LeuLeuOMe brez in v prisotnosti inhibitorjev označili s kemikalijo MitoTracker Red CMX-Ros. Iz slike 16 vidimo, da pride do poškodbe mitohondrijev v celicah inkubiranih z LeuLeuOMe in v celicah, katerim smo predhodno dodali inhibitor z-VAD-fmk. Inhibitor E-64d pa poškodbo mitohondrijske membrane prepreči (Slika 16). Na ta način smo potrdili, da so katepsini odgovorni za posredno destabilizacijo mitohondrijev.



Slika 16: Odstotek celic HaCaT s poškodovanimi mitohondriji po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe. LeuLeuOMe povzroči poškodbo mitohondrijev v celicah, v katerih pride do nižje intenzitete rdeče barve. Inhibitor z-VAD-fmk na poškodbo mitohondrijev nima vpliva, prisotnost inhibitorja E-64d pa je poškodbo mitohondrijev preprečila.

#### 4.1.1.5 Imunodetekcija antiapoptotskih proteinov Bcl-xL, Mcl-1 in Bcl-2

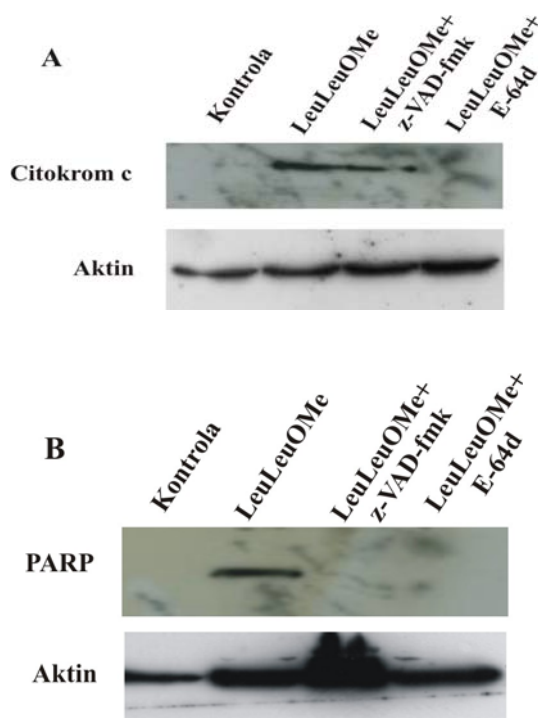
*In vitro* je bilo pokazano, da lahko cisteinski katepsini cepijo ali razgrajujejo tudi antiapoptotске proteine, kot so Bcl-2, Bcl-xL in Mcl-1 (Droga-Mazovec et al., 2008). Zato nas je zanimalo, ali so lahko ti proteini tudi tarče katepsinov pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe v celicah HaCaT. Po 16 urni inkubaciji smo pripravili popolne celične lizate in izvedli imunodetekcijo molekule Bcl-xL, Mcl-1 in Bcl-2. Na sliki 17 vidimo, da je po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe, prišlo do razgradnje proteina Bcl-xL. Prisotnost inhibitorja E-64d je to razgradnjo preprečila (Slika 17). Pri proteinu Mcl-1 pa ni prišlo niti do cepitve niti do razgradnje. Proteina Bcl-2 pa nam ni uspelo zaznati. Katepsini torej, lahko poleg proteina Bid cepijo tudi antiapoptotске proteine in na ta način sprožijo apoptozo in destabilizacijo mitohondrijev na več načinov.



Slika 17: Imunodetekcija proteina Bcl-xL in Mcl-1 po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe v celicah HaCaT. Po dodatku LeuLeuOMe pride do razgradnje proteina Bcl-xL. Inhibitor z-VAD-fmk na razgradnjo proteina Bcl-xL ni imel vpliva, E-64d pa je to razgradnjo preprečil. Pri proteinu Mcl-1 pa ni prišlo niti do cepitve niti do razgradnje.

#### 4.1.1.6 Imunodetekcija citokroma c in cepljene oblike proteina PARP

Pokazali smo, da pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe pride najprej do destabilizacije lizosomske membrane, temu pa je sledi poškodba mitohondrijske membrane. Nadalje smo še preverili ali pride po poškodbi mitohondrijske membrane do sprostitve citokroma c in ali pride do cepitve molekule PARP v 85 kDa velik fragment, kar je značilno za apoptozo. Tako smo pripravili citosolne celične lizate za imunodetekcijo citokroma c in popolne celične lizate za imunodetekcijo molekule PARP. Citokrom c se sprosti iz mitohondrijev v prisotnosti LeuLeuOMe in tudi dodatek inhibitorja z-VAD-fmk te sprostitve ne prepreči (Slika 18 A). Cepljeno obliko molekule PARP pa smo zaznali le v celicah, katerim smo dodali LeuLeuOMe. Prisotnost inhibitorjev je to cepitev preprečila (Slika 18 B).



Slika 18: Imunodetekcija citokroma c in cepljene oblike molekule PARP po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe v celicah HaCaT. (A) Do sprostitve citokroma c je prišlo v celicah, ki smo jim dodali LeuLeuOMe in LeuLeuOMe v kombinaciji z inhibitorjem z-VAD-fmk. (B) Cepljeno obliko molekule PARP smo zaznali le v celicah, ki smo jim dodali LeuLeuOMe. Prisotnost inhibitorjev z-VAD-fmk ali E-64d je cepitev molekule PARP preprečila.

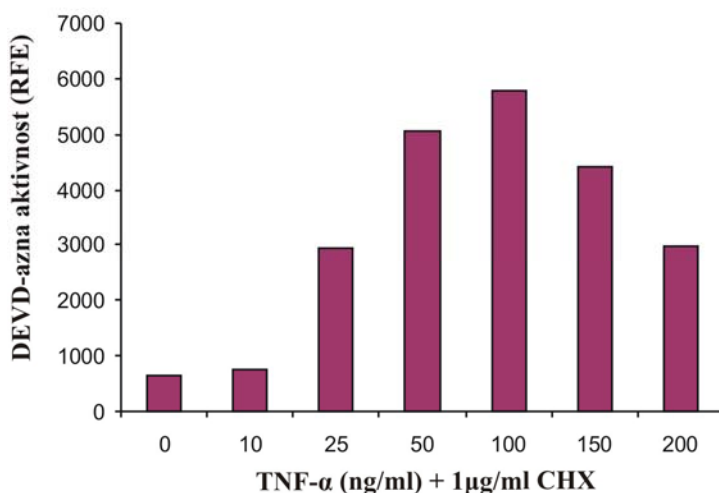
## 4.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L

Tudi pri apoptozi sproženi preko receptorjev smrti prihaja do destabilizacije lizosomov in posledičnega iztekanja katepsinov v citosol (Guicciardi et al., 2000; Foghsgaard et al., 2001; Werneburg et al., 2002; Werneburg et al., 2004). Natančni mehanizmi in signalne poti, ki vodijo k poškodbi lizosomskih membran po sprožitvi apoptoze preko receptorjev smrti, še niso povsem razjasnjene, verjetno pa vključujejo znotrajcelični sfingozin, ceramid, proteine iz družine Bcl-2 in reaktivne kisikove zvrsti (Guicciardi et al., 2004; Werneburg et al., 2004; Boya and Kroemer, 2008). Da bi poskušali natančneje ugotoviti vlogo lizosomov in lizosomskih proteaz pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$ , smo kot modelni sistem vzeli mišje embrionalne fibroblaste divjega tipa in tiste z izbitim genom za katepsin L ali katepsin B.

### 4.2.1 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa

#### 4.2.1.1 Določitev optimalne koncentracije TNF- $\alpha$ v prisotnosti CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa

Da bi določili koncentracijo TNF- $\alpha$ , ki najučinkoviteje sproži apoptozo v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa smo celice inkubirali z naraščajočimi koncentracijami TNF- $\alpha$  v prisotnosti 1  $\mu$ g/ml cikloheksimida. Vezava liganda TNF- $\alpha$  na receptor TNF-R1 sproži apoptozo le v primeru, ko je aktivacija NF- $\kappa$ B zavrnjena, zato je potrebna uporaba cikloheksimida kot inhibitorja proteinske sinteze. Po 14 urah inkubacije z različnimi koncentracijami TNF- $\alpha$  v prisotnosti 1  $\mu$ g/ml CHX smo pripravili popolne celične lizate in v njih izmerili DEVD-azno aktivnost. Na podlagi dobljenih rezultatov (Slika 19) smo se odločili, da bomo uporabljali TNF- $\alpha$  v koncentraciji 100 ng/ml, saj je bila pri tej koncentraciji DEVD-azna aktivnost najvišja.

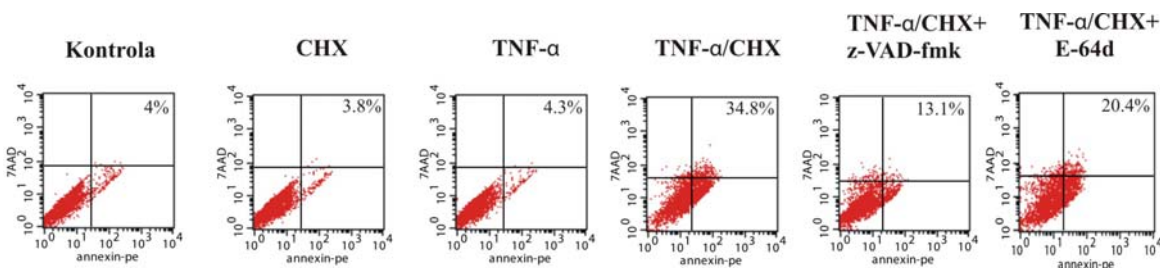


Slika 19: DEVD-azna aktivnost v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po sprožitvi apoptoze s TNF $\alpha$ /CHX. DEVD-azna aktivnost je najvišja po 14 urni inkubaciji s 100 ng/ml TNF- $\alpha$ . Pri uporabi višjih koncentracij TNF- $\alpha$  pa je bila opažena nižja aktivnost kaspaz.

#### 4.2.1.2 Delež apoptotskih celic in imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa v prisotnosti inhibitorjev, z-VAD-fmk ali E-64d

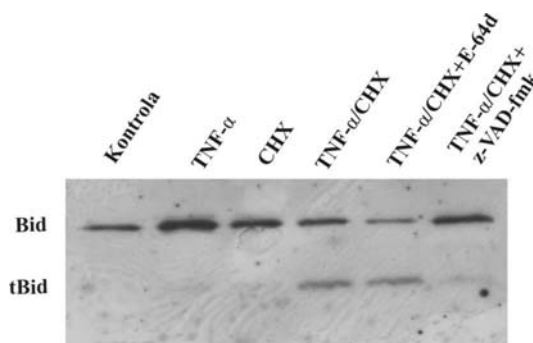
Aktivacija receptorjev smrti iz družine TNF-R lahko sproži od kaspaz-odvisno in od kaspaz-neodvisno celično smrt. Predpostavili so, da se lahko po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$  v primarnih celicah, poleg kaspaz aktivirajo tudi cisteinski katepsini, ki omogočijo sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev v citosol (Guicciardi et al., 2000; Foghsgaard et al., 2001).

Da bi ugotovili, kakšno vlogo imajo cisteinski katepsini na apoptozo sproženo preko TNF- $\alpha$  na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa, smo celice inkubirali s 100 ng/ml TNF- $\alpha$  v kombinaciji z 1 µg/ml CHX 14 ur, in jim dve uri pred dodatkom TNF- $\alpha$ /CHX dodali z-VAD-fmk ali E-64d. Celice smo na koncu inkubacije označili z Annexin-V-PE in 7-AAD ter fluorescenco pomerili s pretočnim citometrom. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic se je povečal v celicah, kjer smo dodali TNF- $\alpha$  v kombinaciji s CHX. Odstotek apoptotskih celic je bil za približno 65 % nižji v celicah, ki smo jim pred dodatkom TNF- $\alpha$ /CHX dodali z-VAD-fmk in približno 40 % nižji v celicah, ki smo jim predhodno dodali E-64d (Slika 20). Čeprav tudi katepsini na našem celičnem modelu pomembno prispevajo k sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX, smo ugotovili, da je apoptoza pretežno odvisna od kaspaz.



Slika 20: Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX. Največ zgodnje/pozno apoptotskih celic opazimo po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX, sam CHX ali sam TNF- $\alpha$  pa na apoptozo nimata nobenega vpliva. Dodatek inhibitorja z-VAD-fmk je znižal odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic na 13.1, E-64d pa na 20.4.

Po aktivaciji receptorja TNF lahko kaspaza-8 cepi molekulo Bid (Li et al., 1998). Tako smo se odločili preveriti, ali pride do cepitve molekule Bid na našem celičnem modelu po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX in kako na cepitev molekule Bid vpliva dodatek inhibitorjev z-VAD-fmk ali E-64d. Do cepitve proteina Bid je prišlo v celicah inkubiranih s TNF- $\alpha$ /CHX in v celicah, ki smo jim dodali inhibitor E-64d. Inhibitor z-VAD-fmk pa je cepitev proteina Bid preprečil (Slika 21), kar kaže na ključno vlogo kaspaze-8 pri apoptozi sproženi preko TNF receptorja na našem celičnem modelu.

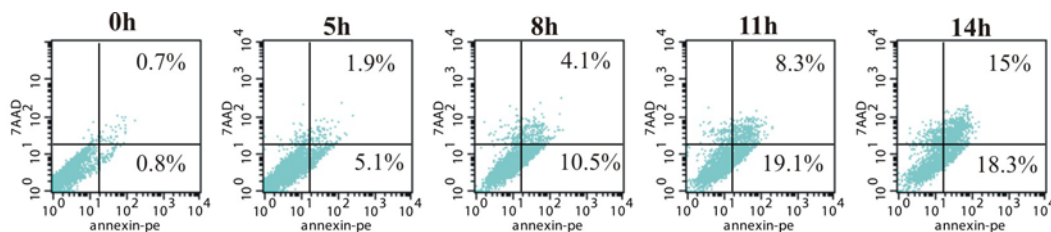


Slika 21: Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa. Do cepitve proteina Bid je prišlo v celicah inkubiranih s TNF- $\alpha$ /CHX in v celicah, ki smo jim dodali inhibitor E-64d. Inkubacija celic z inhibitorjem z-VAD-fmk pa je cepitev preprečila.

#### 4.2.1.3 Delež apoptotskih celic

Nadalje nas je zanimal tudi časovni potek apoptoze sprožene preko TNF- $\alpha$ /CHX na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa, zato smo po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX celice označili z Annexin-V-PE in 7-AAD ter fluorescenco pomerili s pretočnim citometrom.

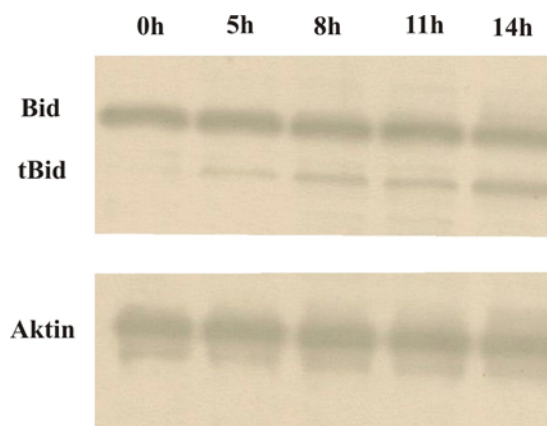
Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic je s časom naraščal in po 14 urah dosegel 33 odstotkov (Slika 22).



Slika 22: Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v prisotnosti TNF- $\alpha$ /CHX je s časom naraščal in po 14 urah dosegel 18.3 odstotkov zgodnje-apoptotskih celic in 15 odstotkov pozno-apoptotskih celic.

#### 4.2.1.4 Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid

Mišji embrionalni fibroblasti so celice tipa II in za njih je značilno, da je za sprožitev apoptoze preko receptorja Fas potrebno sodelovanje mitohondrijev (Scaffidi et al., 1998). Cepitev proteina Bid je povezana z destabilizacijo mitohondrijev. Zato nas je zanimalo, kdaj pride do cepitve proteina Bid, po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$  na našem celičnem modelu. Po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX smo pripravili popolne celične lizate za imunodetekcijo cepljene oblike proteina Bid. Celične lizate smo ločili z NaDS PAGE, jih prenesli na nitrocelulozno membrano s prenosom Western ter izvedli imunodetekcijo cepljene oblike proteina Bid. Cepljeno obliko proteina Bid smo zaznali že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX (Slika 23).



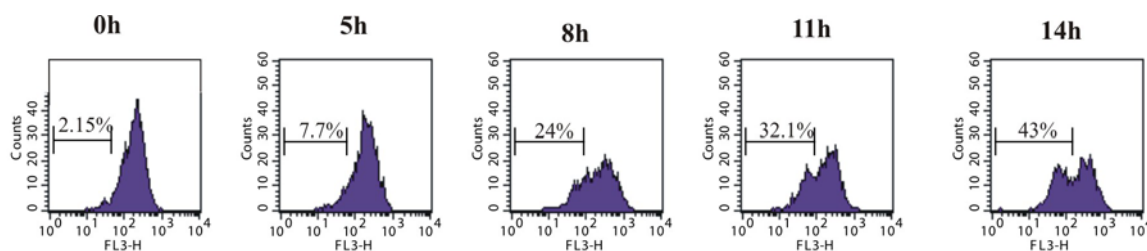
Slika 23: Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do cepljene oblike proteina Bid pride že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX.

#### 4.2.1.5 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji in lizosomi

Na mišjih dermalnih fibroblastih smo pokazali, da pri apoptozi sproženi s Fas ligandom, destabilizaciji mitohondrijske membrane sledi destabilizacija lizosomov (Bojič et al., 2007). Zato nas je zanimalo, kdaj pride do poškodbe mitohondrijske in lizosomske membrane na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX.

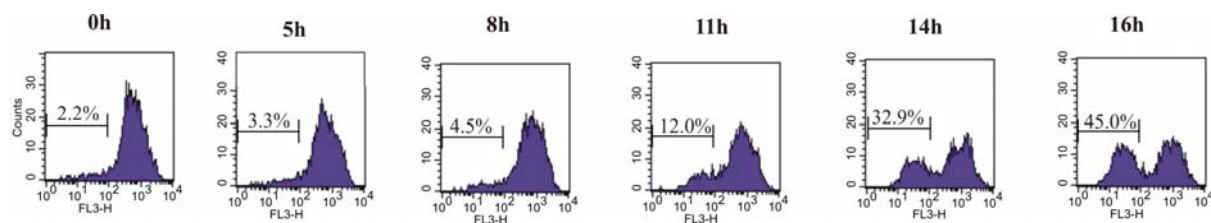
Za določitev deleža celic, ki so imele poškodovane mitohondrije (Slika 24) in lizosome (Slika 25) med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX smo uporabili fluorescentno barvilo MitoTracker Red CMX-Ros in akridin oranž.

Odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji je začel naraščati že po petih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX in dosegel vrednost 43 % po 14 urah inkubacije (Slika 24).



Slika 24: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi mitohondriji po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do poškodbe mitohondrijske membrane je prišlo že po 5 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer je bilo 7.7 % svetlo rdečih celic oziroma celic s poškodovanimi mitohondriji. V nadaljnjih urah inkubacije je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji samo še naraščal.

Podobno kot pri apoptozi sproženi s Fas JO2 protitelesi na mišjih dermalnih fibroblastih, smo tudi pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$ /CHX na mišjih embrionalnih fibroblastih pokazali, da destabilizaciji mitohondrijev sledi destabilizacija lizosomov. Do destabilizacije lizosomske membrane je prišlo šele po 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX (Slika 25), kar je bistveno kasneje kot destabilizacija mitohondrijske membrane in kaže na to, da je vloga lizosomov in lizosomskih proteaz verjetno v ojačitveni zanki.

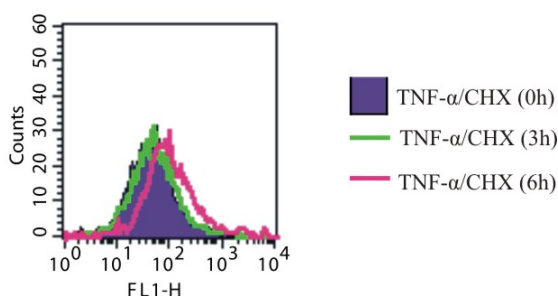


Slika 25: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov s poškodovanimi lizosomi po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do poškodbe lizosomske membrane je prišlo šele po približno 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer je odstotek svetlo rdečih celic, oziroma celic s poškodovanimi lizosomi začel šele naraščati, in dosegel vrednost 33% po 14 urni inkubaciji, po 16 urni inkubaciji pa že 45%.

#### 4.2.1.6 Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX

Znano je, da se ob poškodbi mitohondrijske membrane tvorijo reaktivne kisikove zvrsti, zato nas je zanimalo, ali pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti po destabilizaciji mitohondrijske membrane med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX na našem celičnem modelu, in ali te vplivajo na poškodbo lizosomske membrane.

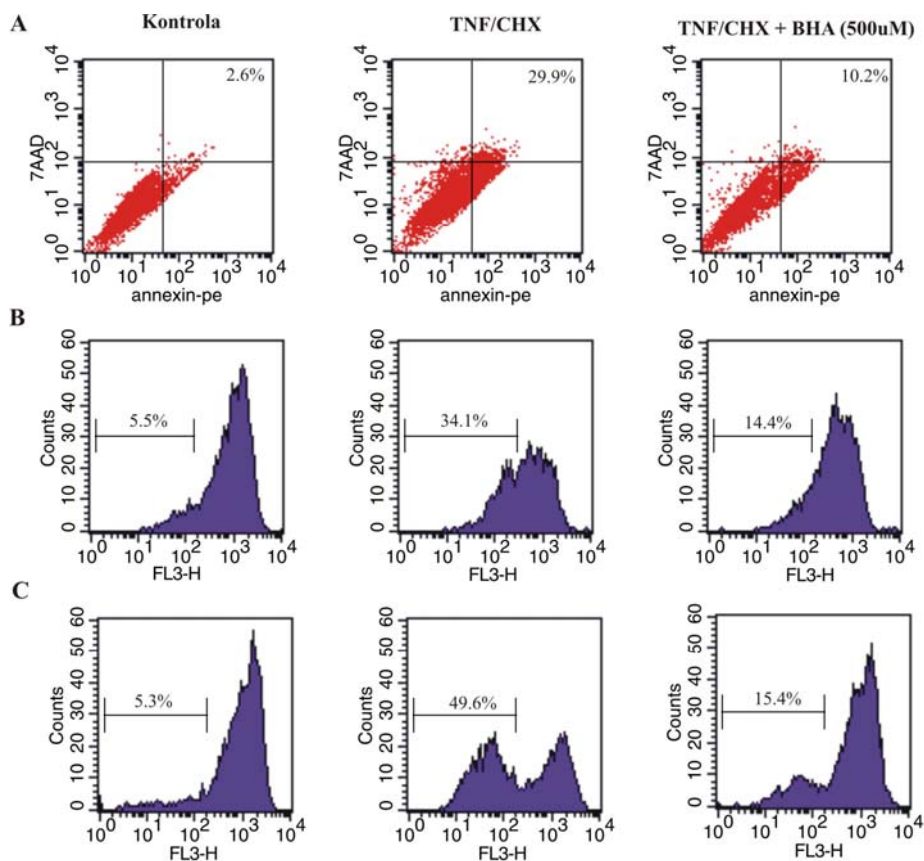
Za spremljanje nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti smo uporabili barvilo CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti je prišlo takoj po poškodbi mitohondrijske membrane, to je po 6 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo več zeleno fluorescirajočih celic (Slika 26). Tri urna inkubacija s TNF- $\alpha$ /CHX še ne povzroči nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (Slika 26), kar kaže na to, da novonastale reaktivne kisikove zvrsti izhajajo iz poškodovanih mitohondrijev.



Slika 26: Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX. Do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti pride po 6 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo več zelenofluorescirajočih celic. Tri urna inkubacija s TNF- $\alpha$ /CHX še ne povzroči nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti.

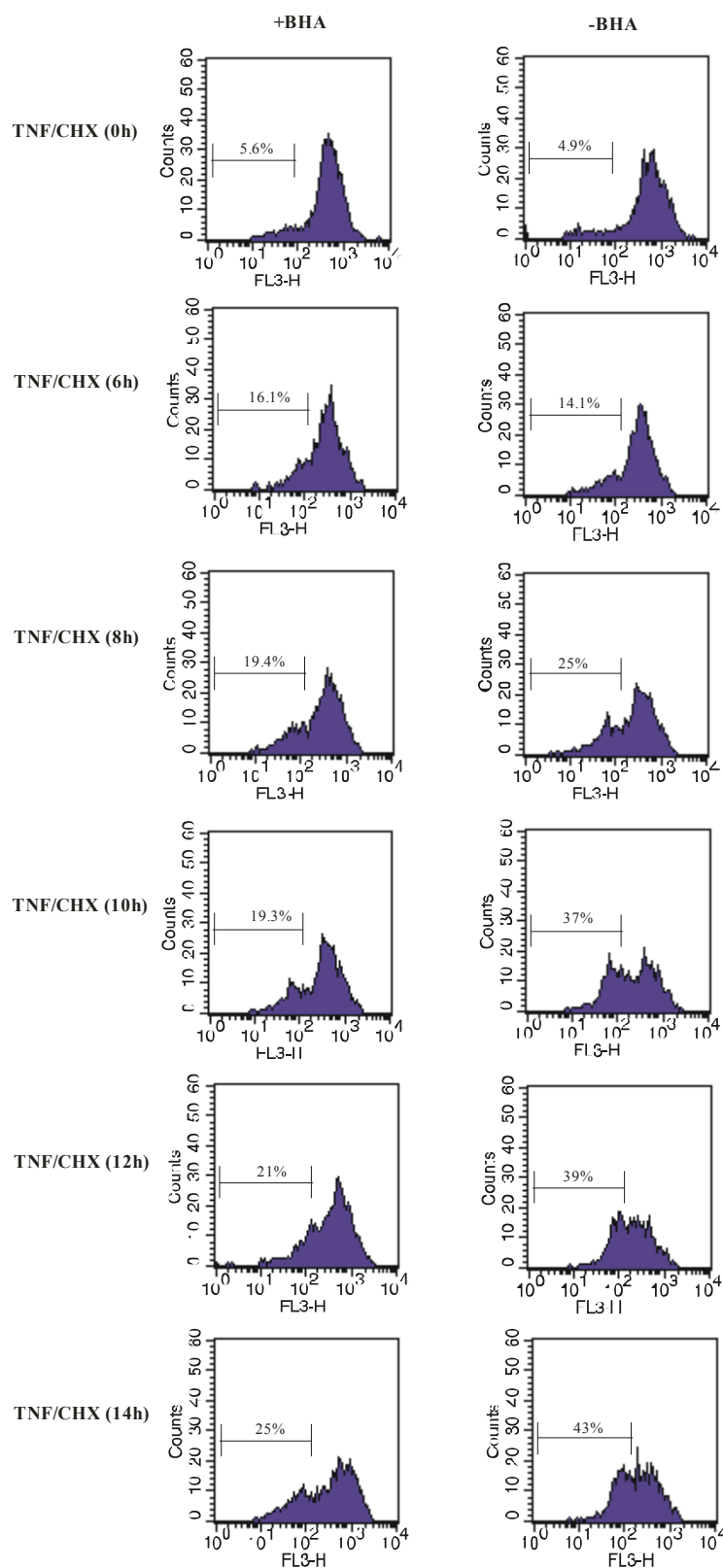
#### 4.2.1.7 Vpliv butiliranega hidroksianizola (BHA), odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti, na delež apoptotskih celic, delež celic s poškodovanimi mitohondriji in delež celic s poškodovanimi lizosomi

Ugotovili smo, da na našem celičnem modelu pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti po poškodbi mitohondrijske membrane (Slika 26). Da bi ugotovili, kakšen vpliv imajo te reaktivne kisikove zvrsti na poškodbo lizosomske membrane, smo uporabili odstranjevalec reaktivnih kisikovih zvrsti BHA. Po 14 urni inkubaciji celic s TNF- $\alpha$ /CHX, smo v prisotnosti in odsotnosti BHA pomerili delež apoptotskih celic, odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji in odstotek celic s poškodovanimi lizosomi. Iz slike 27 A lahko vidimo, da inkubacija celic z BHA zmanjša odstotek zgodnje/pozno-apoptotskih celic na 10.2, v primerjavi s celicami, katerim nismo dodali BHA, kjer je ta odstotek 29.9. Predinkubacija celic z BHA vpliva tudi na manjši odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji (Slika 27 B) in manjši odstotek celic s poškodovanimi lizosomi (Slika 27 C). Tako smo ugotovili, da so reaktivne kisikove zvrsti, ki nastanejo pri poškodbi mitohondrijske membrane najverjetneje odgovorne za destabilizacijo lizosomske membrane na našem celičnem modelu, saj je bil odstotek celic s poškodovanimi lizosomi bistveno manjši v celicah, katerim smo predhodno dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali (Slika 27 C).



Slika 27: Odstotek zgodnje/pozno apoptotnih celic, odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji in odstotek celic s poškodovanimi lizosomi v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. (A) Predinkubacija celic z BHA povzroči manjši odstotek zgodnje/pozno-apoptotnih celic po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. (B) Odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji je manjši v celicah, katerim smo dodali BHA. (C) Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi je po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX manjši v celicah, katerim smo predhodno dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali.

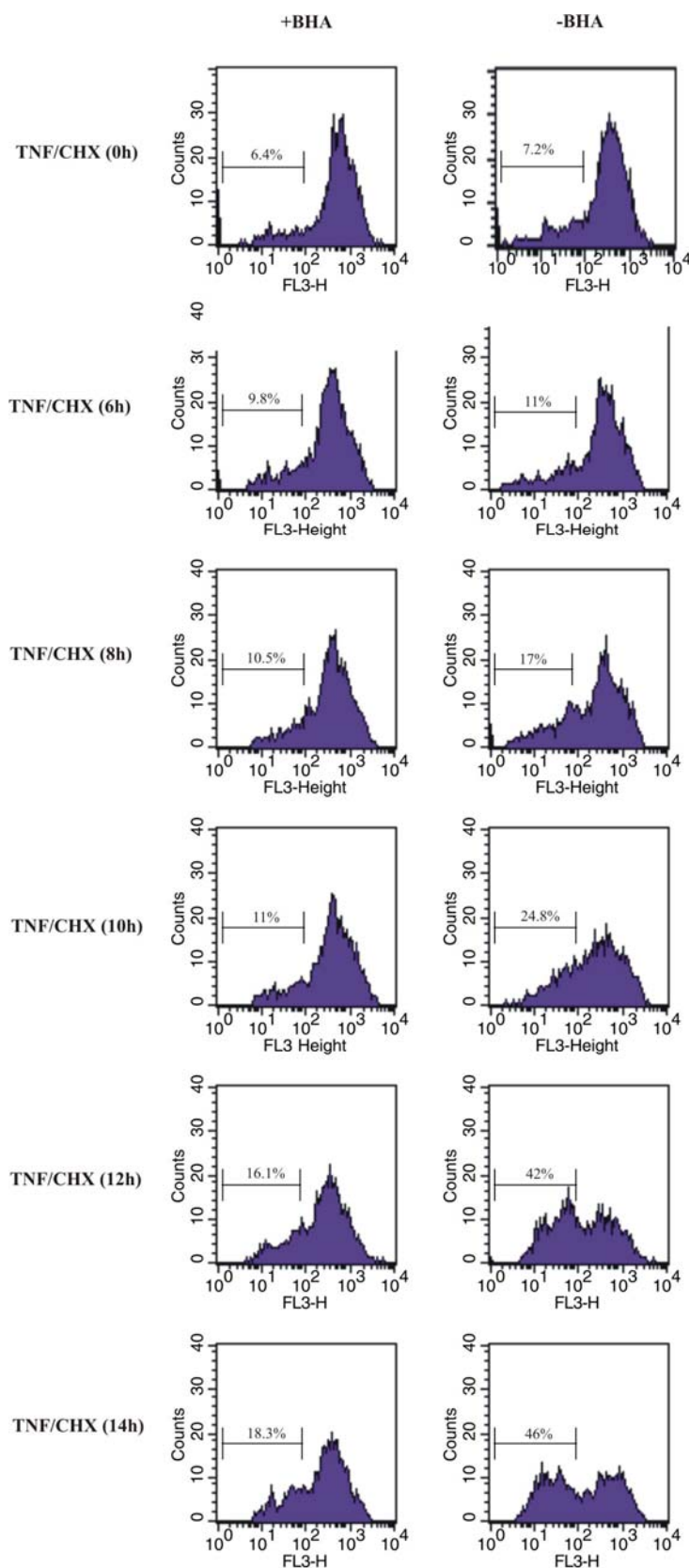
Na sliki 27 B vidimo, da se po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti BHA, zniža tudi odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji, zato nas je nadalje zanimalo, kako dodatek BHA vpliva na poškodbo mitohondrijske membrane in odstotek zgodnje/pozno apoptotnih celic v začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Tako smo po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA pomerili delež apoptotnih celic, odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji in odstotek celic s poškodovanimi lizosomi. Na sliki 28 lahko vidimo, da predinkubacija celic z BHA ne vpliva na odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji v začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do razlik v odstotku celic s poškodovanimi mitohondriji pride šele po približno 10 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX in to v celicah, katerim smo dodali BHA. V začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji primerljivo narašča tako v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali. V nadaljnjih urah inkubacije ta odstotek še naprej narašča v celicah, katerim nismo dodali BHA, v celicah katerim smo dodali BHA, pa se ta odstotek upočasni. Dobljeni rezultati tako nakazujejo na medsebojni vpliv med lizosomi in mitohondriji, predvsem v poznejših časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.



Slika 28: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi mitohondriji po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. V začetnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji podoben tako v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah brez odstranjevalca. Po 10 urni inkubaciji pa je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji, katerim smo dodali odstranjevalec BHA precej manjši od odstotka celic s poškodovanimi mitohondriji, kjer odstranjevalca BHA nismo dodali.

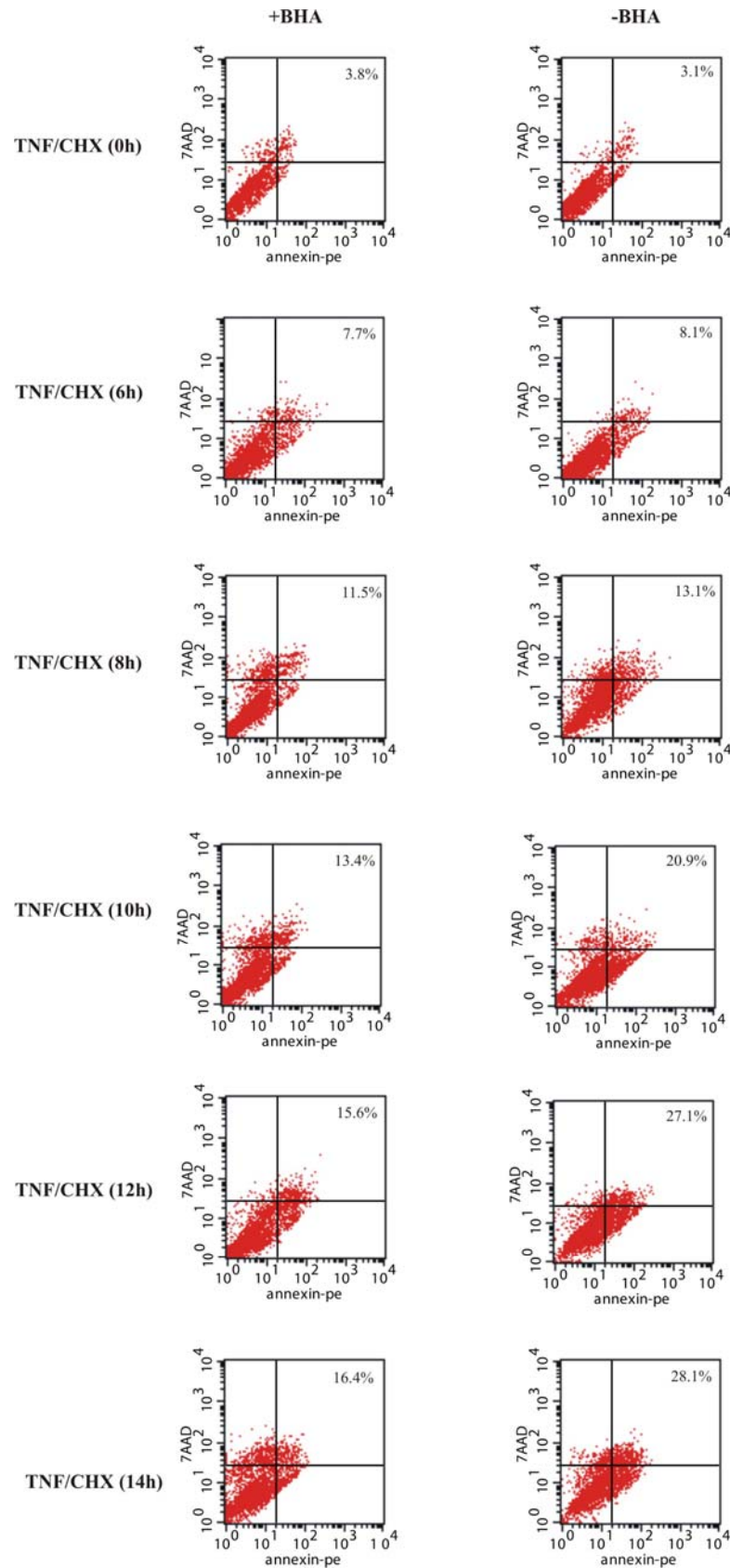
Pogledali smo tudi kako dodatek BHA vpliva na odstotek celic s poškodovanimi lizosomi. Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi začne naraščati šele v poznejših časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX in sicer v

celicah, katerim nismo dodali BHA. Predinkubacija celic z BHA pa bistveno zmanjša odstotek celic s poškodovanimi lizosomi (Slika 29).



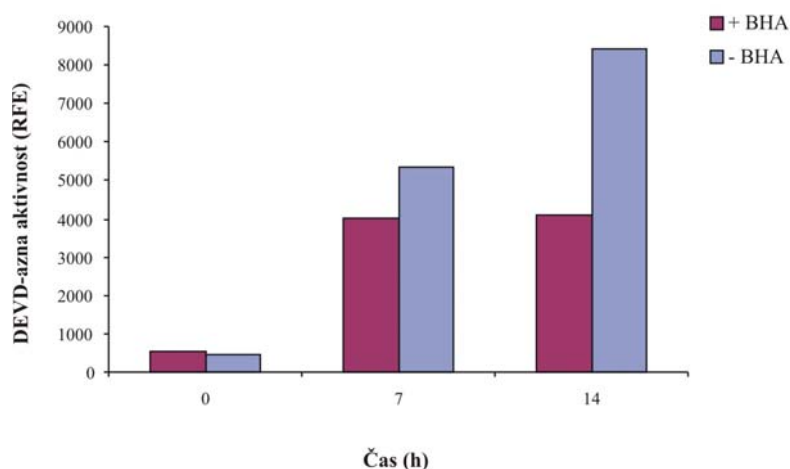
Slika 29: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi lizosomi po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi narašča bistveno počasneje v celicah, katerim smo dodali BHA kot v celicah, katerih BHA nismo dodali.

Preverili smo tudi kako dodatek BHA vpliva na časovni potek apoptoze in ugotovili, da se odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic začne manjšati po približno 10 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX in sicer v celicah, katerim smo dodali BHA (Slika 30).



Slika 30: Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic narašča bistveno počasneje v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah brez BHA.

Izmerili smo tudi DEVD-azno aktivnost in ugotovili, da je le-ta po sedmih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX podobna, tako v celicah katerim smo dodali BHA, kot v celicah katerim BHA nismo dodali. Po 14 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX pa je DEVD-azna aktivnost nižja v celicah, katerim smo predhodno dodali BHA (Slika 31). To nakazuje, da je povečana aktivnost izvrševalnih kaspaz po 14 urah dejansko posledica ojačitve signala preko poškodbe organelov z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi.

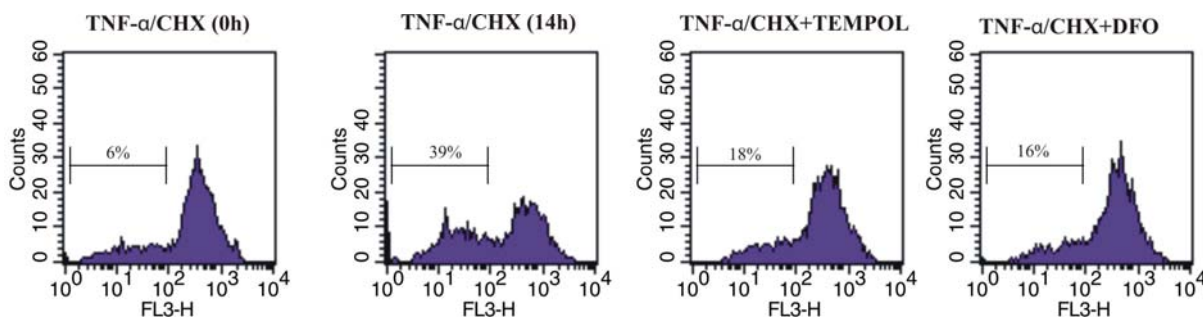


Slika 31: DEVD-azna aktivnost v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po 7 in 14 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. DEVD-azna aktivnost je po 7 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX podobna tako v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali. Po 14 urah inkubacije pa je DEVD-azna aktivnost nižja v celicah, katerim smo dodali BHA, v primerjavi s celicami, katerim BHA nismo dodali.

#### 4.2.1.8 Vpliv TEMPOLA, odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti, in DESFEROKSAMINA, kelatorja železovih ionov, na odstotek celic s poškodovanimi lizosomi

Z namenom, da bi dodatno potrdili, da so reaktivne kisikove zvrsti najverjetneje odgovorne za poškodbo lizosomske membrane pri apoptozi sproženi preko TNF-R1 na našem celičnem modelu, smo se odločili, da uporabimo še en odstranjevalec reaktivnih kisikovih zvrsti TEMPOL, in kelator železovih ionov, desferoksamin ali DFO. Tako uporaba TEMPOLA, kot tudi kelatorja železovih ionov, je preprečila poškodbo lizosomske membrane po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa (Slika 32).

Z uporabo DFO smo tudi pokazali, da je za poškodbo lizosomske membrane zelo verjetno odgovoren vodikov peroksid (reaktivne kisikove zvrsti), ki nastane pri poškodbi mitohondrijske membrane, penetrira v lizosome in znotraj njih skupaj z železovimi ioni preko Fentonove reakcije tvori visoko toksičen hidroksilni radikal, ki lahko poškoduje lizosomsko membrano. To je ključnega pomena, saj nakazuje, da toksične reaktivne kisikove zvrsti dejansko izhajajo iz lizosomov in ne gre za direktno poškodbo mitohondrijev z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi iz poškodovanih mitohondrijev.



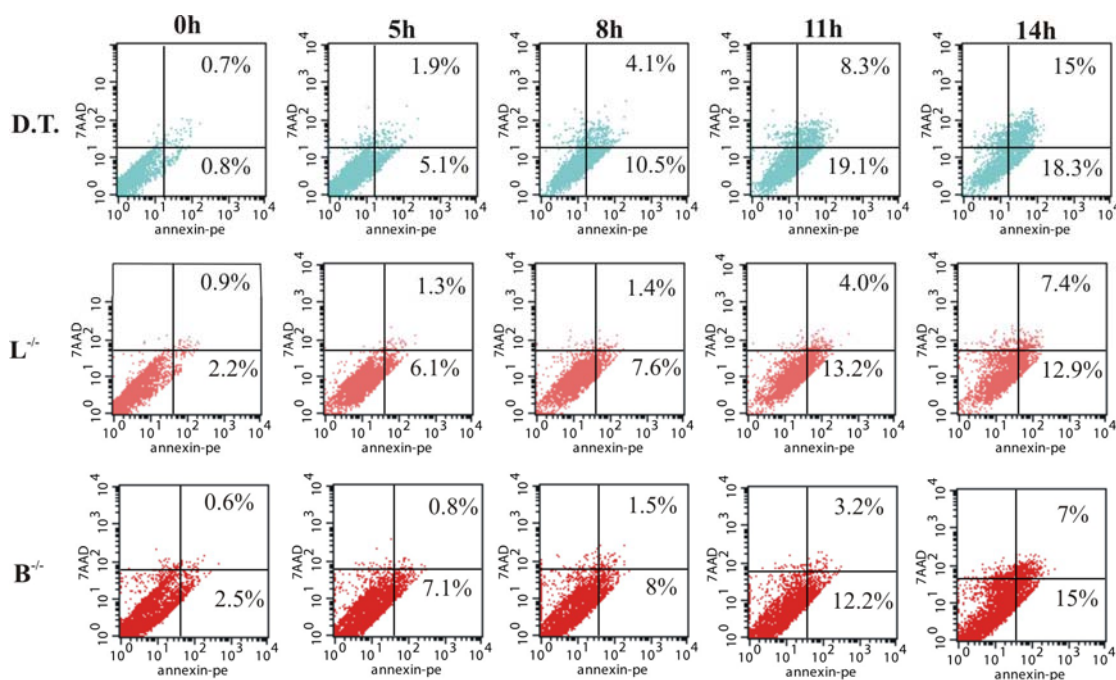
Slika 32: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi lizosomi po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti TEMPOLA in DFO. Tako kelator železovih ionov DFO kot tudi odstranjevalec reaktivnih kisikov zvrsti TEMPOL, zaščitita lizosomsko membrano pred poškodbo.

## 4.2.2 Sprožitev apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L

Pokazano je bilo, da imajo nekateri cisteinski katepsini, predvsem katepsin B, pomembno vlogo pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$  (Guicciardi et al., 2000; Foghsgaard et al., 2001; Fehrenbacher et al., 2004; Werneburg et al., 2002). Na osnovi naših rezultatov dobljenih na celicah divjega tipa, ki kažejo, da poškodba lizosomov ni primarni dogodek med apoptozo sproženo preko TNF receptorja, smo se odločili da še preverimo, kakšno vlogo imata potemtakem katepsin B in katepsin L v tem procesu na našem celičnem modelu.

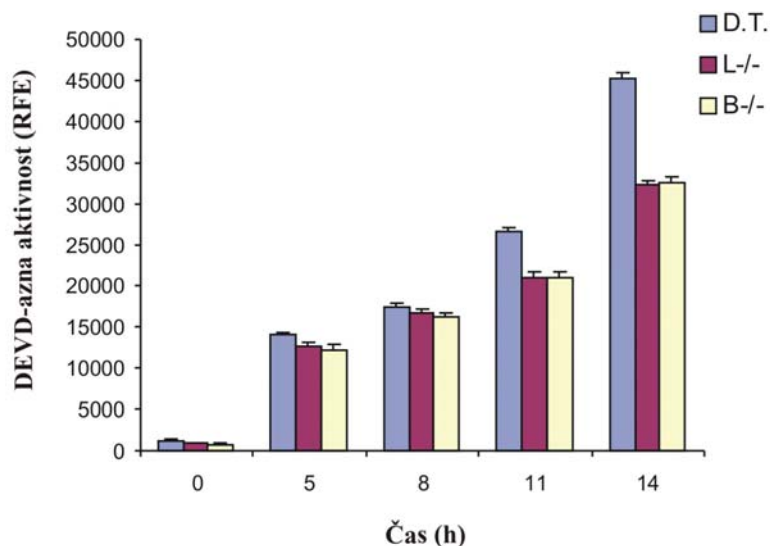
### 4.2.2.1 Delež apoptotskih celic

Apoptozo v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitima genoma za katepsin B ali katepsin L smo sprožili po enakem postopku kot v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa. Odstotek zgodnje in pozno-apoptotskih celic po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX smo pomerili s pretočno citometrijo in primerjali te odstotke s fibroblasti divjega tipa (Slika 33). Ugotovili smo, da v začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX odstotek zgodnje in pozno-apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L narašča podobno kot v fibroblastih divjega tipa (Slika 33). Po 11 urah inkubacije pa je odstotek zgodnje in pozno-apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L manjši v primerjavi z odstotkom teh celic v fibroblastih divjega tipa (Slika 33).



Slika 33: Primerjava odstotka zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX narašča zelo podobno tako v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L kot v celicah divjega tipa. Do vidnejših razlik v odstotku apoptotskih celic med celicami divjega tipa in tistimi z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L pa pride šele po daljšem času inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.

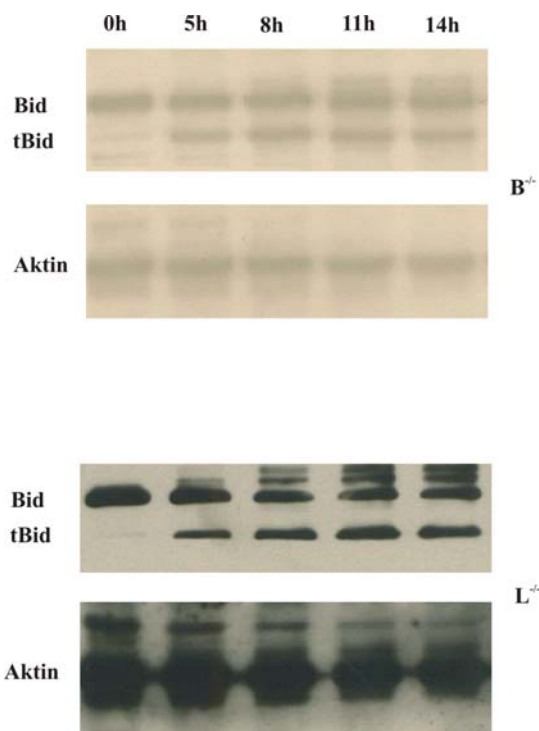
Po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX smo izmerili tudi DEVD-azno aktivnost in dobili podobne rezultate kot s pretočno citometrijo. Do vidnejših razlik v DEVD-azni aktivnosti med celicami divjega tipa in celicami z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L je prišlo šele po 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX (Slika 34). Po 11 urni inkubaciji namreč opazimo nižjo DEVD-azno aktivnost v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L kot v celicah divjega tipa.



Slika 34: DEVD-azna aktivnost v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. DEVD-azna aktivnost narašča s časom inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX tako v celicah divjega tipa kot v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L. Po daljšem času inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX pride do manjše DEVD-azne aktivnosti v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L v primerjavi s celicami divjega tipa.

#### 4.2.2.2 Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid

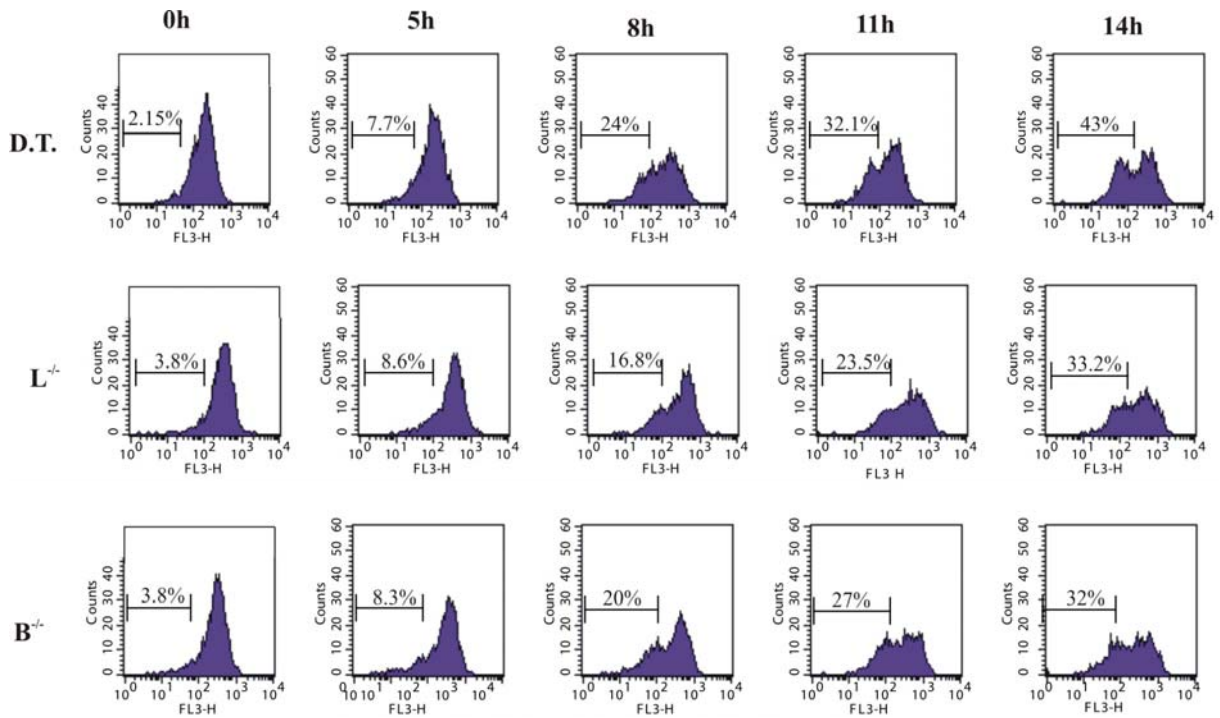
Preverili smo tudi, ali je začetna pot apoptoze sprožena s TNF- $\alpha$ /CHX, podobna tako v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L kot v celicah divjega tipa. Tako smo izvedli imunodetekcijo cepljene oblike proteina Bid. Tudi v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L pride do cepitve proteina Bid že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kar potrdi, da je začetna pot apoptoze sprožena preko TNF-R1 v celicah divjega tipa in v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L ista (Slika 35).



Slika 35: Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Cepljeno obliko proteina Bid opazimo že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX tako v celicah z izbitim genom za katepsin B kot tudi v celicah z izbitim genom za katepsin L.

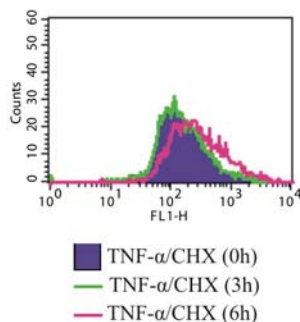
#### 4.2.2.3 Določanje deleža celic s poškodovanimi mitohondriji in nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L

Nadalje nas je tudi zanimalo, kdaj začne naraščati odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L. Na sliki 36 lahko vidimo, da začne odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L, podobno kot v celicah divjega tipa, naraščati že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. Ta odstotek s časom inkubacije samo še narašča in po 14 urah inkubacije doseže vrednost 43% v celicah divjega tipa in 33,2% oziroma 32% v celicah z izbitim genom za katepsin L ali katepsin B. Po daljšem času inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX tako opazimo manj celic s poškodovanimi mitohondriji v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L, kot v celicah divjega tipa, kar še dodatno potrjuje, da je vloga lizosomskih proteaz verjetno v ojačitveni zanki.



Slika 36: Primerjava odstotka celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastov z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L s poškodovanimi mitohondriji po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Podobno kot v celicah divjega tipa se tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L poškodba mitohondrijev začne že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. Do razlik v deležu celic s poškodovanimi mitohondriji med celicami divjega tipa in celicami z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L pride šele po 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L manj celic s poškodovanimi mitohondriji kot v celicah divjega tipa.

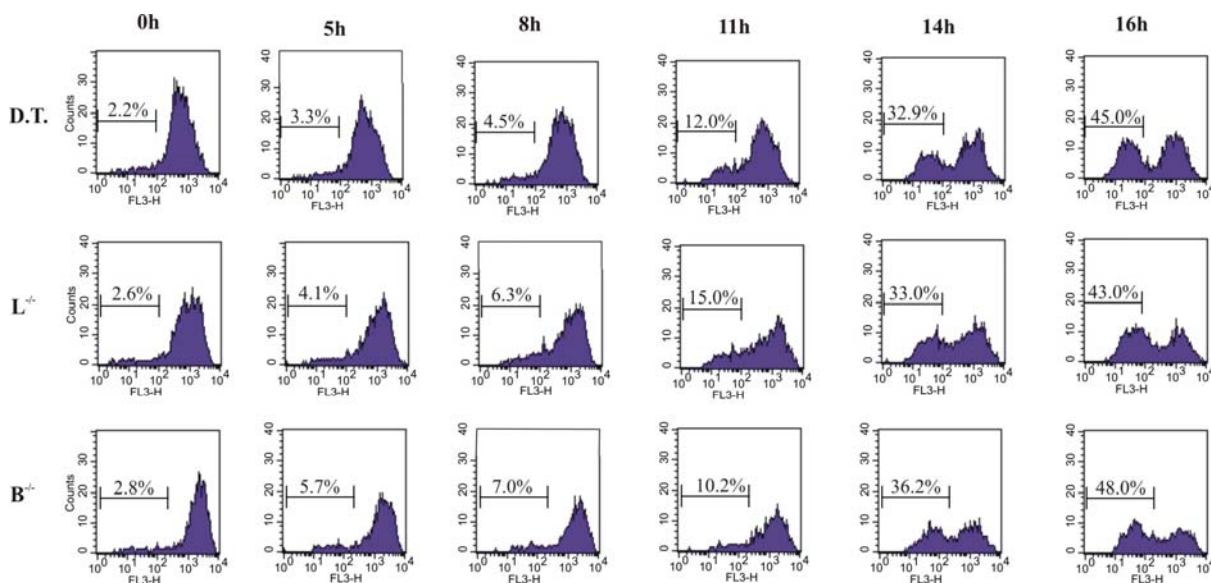
Preverili smo še, ali pride tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B, po poškodbi mitohondrijske membrane do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti. Iz slike 37 lahko vidimo, da se podobno kot v celicah divjega tipa, tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B reaktivne kisikove zvrsti tvorijo šele po poškodbi mitohondrijske membrane, t.j. po šest urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. Tri urna inkubacija s TNF- $\alpha$ /CHX tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B ne povzroči nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (Slika 37).



Slika 37: Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX. Do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti pride po 6 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo več zelenofluoroscirajočih celic. Tri urna inkubacija s TNF- $\alpha$ /CHX še ne povzroči nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti.

#### 4.2.2.4 Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L

Podobno kot v celicah divjega tipa je prišlo tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L do poškodbe lizosomske membrane za mitohondriji, približno po 11 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer pa ne opazimo nobenih razlih v odstotku celic s poškodovanimi lizosomi med celicami divjega tipa in celicami z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L (Slika 38).



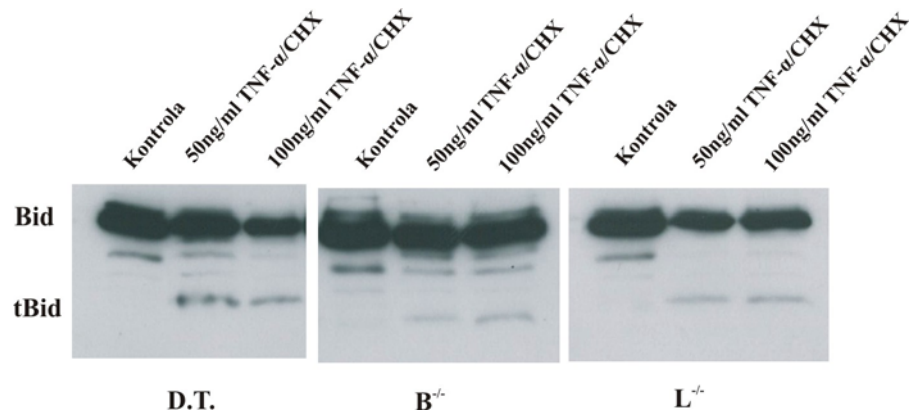
Slika 38: Primerjava odstotka celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastov z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L s poškodovanimi lizosomi po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Podobno kot v celicah divjega tipa se tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L poškodba lizosomske membrane začne šele po približno 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX in odstotek celic s poškodovanimi lizosomi v vseh treh celičnih linijah primerljivo narašča s časom inkubacije.

#### 4.2.2.5 Imunodetekcija molekule Bid

Pokazano je bilo, da je proapoptotski protein Bid iz družine Bcl-2 proteinov, substrat katepsinov po destabilizaciji lizosomske membrane sprožene preko notranje ali mitohondrijski poti (Stoka et al., 2001; Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008). Do cepitve proteina Bid je prišlo tudi po aktivaciji receptorja Fas na mišjih dermalnih fibroblastih (Bojič et al., 2007).

Zanimalo nas je, ali je protein Bid substrat za katepsine tudi po destabilizaciji lizosomske membrane sprožene s TNF- $\alpha$ /CHX. Po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX smo tako izvedli imunodetekcijo cepljene oblike proteina Bid. Na sliki 39 opazimo manj cepljene oblike proteina Bid v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L v primerjavi s celicami divjega tipa. To nam potrdi, da je protein Bid substrat katepsinov na našem celičnem modelu, ki najverjetneje predstavljajo le ojačitveno zanko med lizosomi in

mitohondriji.



Slika 39: Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po 14 urni inkubaciji s 50ng/ml in 100ng/ml TNF- $\alpha$ /CHX. Po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX opazimo manj cepljene oblike proteina Bid v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L v primerjavi s celicami divjega tipa.



## 5 Razprava

### 5.1 Sprožitev apoptoze z lizosomotropno snovjo L-levcil-L-levcin metilni ester (LeuLeuOMe) v človeški celični liniji HaCaT

V literaturi je vedno več dokazov ki potrjujejo, da pri različnih oblikah programirane celične smrti sodelujejo tudi cisteinski katepsini, ki po prehodu v citosol sprožijo apoptozo (Leist and Jäättelä, 2001b; Turk et al., 2002a). Kljub temu, da je primarna funkcija lizosomskih proteaz razgradnja proteinov v lizosomih, so katepsini aktivni tudi zunaj njih (Turk et al., 2001). Tip celične smrti, apoptoza ali nekroza, je odvisen od količine sproščenih katepsinov v citosol. Popolno razbitje lizosomov vodi v neregulirano nekrozo, medtem ko zmerno puščanje lizosomov sproži apoptozo (Turk et al., 2002a). V obeh primerih je količina sproščenih katepsinov v citosolu prevelika, da bi endogeni inhibitorji-cistatini uspešno inhibirali njihovo aktivnost (Berg et al., 1995; Claus et al., 1998). Celica lahko posledice manjšega uhajanja lizosomskih proteaz odpravi, če pa je iztekanje encimov tako veliko, da celica škode, ki jo ti encimi naredijo, ne more več popraviti, celica odmre (Turk et al., 2002a). Do destabilizacije lizosomskih membran *in vivo* prihaja predvsem med staranjem in v različnih bolezenskih stanjih, kot so nevrodegenerativne bolezni in ishemija (Li et al., 2000; Mattson, 2000; Turk et al., 2002a). Zmanjšanje stabilnosti lizosomskih membran *in vitro* pa lahko povzročijo sfingozin, oksidativni stres ter lizosomotropne snovi, kot so MSDH in LeuLeuOMe (Kagedal et al., 2001a; Li et al., 2000; Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008). Destabilizacija lizosomov je velikokrat zgodnji dogodek v apoptozi, ki mu sledijo destabilizacija mitohondrijev in aktivacija kaspaz (Guicciardi et al., 2000; Li et al., 2000; Bidere et al., 2003; Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008). Natančni mehanizmi sprožitve celične smrti zaradi destabilizacije lizosomskih membran še zmeraj niso popolnoma razjasnjeni. V citosolu lahko katepsin B, L in aspartatna proteaza, katepsin D, sprožijo permeabilizacijo zunanje mitohondrijske membrane, ki ji sledi od kaspaz-odvisna kot tudi od kaspaz-neodvisna programirana celična smrt (Leist and Jäättelä, 2001b).

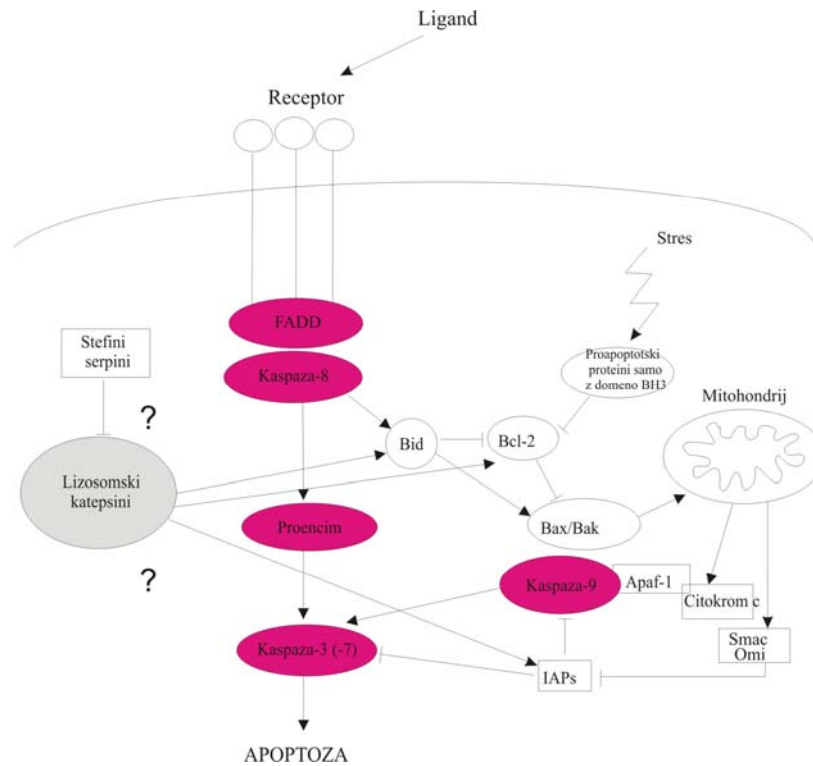
Apoptozo sproženo z LeuLeuOMe smo raziskovali na človeški celični liniji HaCaT. Apoptoza igra tu pomembno vlogo predvsem pri epidermalnem razvoju in preprečevanju rakotvornosti. Pojasnitev vloge cisteinskih katepsinov v notranji poti apoptoze je tako velikega pomena za potrditev vloge teh proteaz kot potencialnih tarč pri zdravljenju raka. Poleg celične linije HaCaT je bilo pretestiranih še sedem drugih celičnih linij različnega izvora z namenom, da bi ugotovili tudi splošni mehanizem apoptoze sprožene z LeuLeuOMe (Droga-Mazovec et al., 2008). Znano je, da LeuLeuOMe sproži apoptozo in za njo značilne morfološke in biokemijske spremembe (Thiele and Lipsky, 1992; Uchimoto et al., 1999; Kobayashi et al., 2000; Cirman et al., 2004, Droga-Mazovec et al., 2008). Zaradi acetiltransferazne aktivnosti lizosomske proteaze katepsina C tvori v lizosomih polimere, ki povzročijo lizo membran lizosomov (Thiele and Lipsky, 1990). Najprej smo na celicah HaCaT izvedli optimizacijo z različnimi koncentracijami LeuLeuOMe. Optimizacija LeuLeuOMe je bila potrebna, saj je znano, da lahko določena kemikalija pri visokih koncentracijah povzroči nekrozo in je za celico tako toksična, pri nižjih koncentracijah pa celice umirajo z apoptozo (Li et al., 2000). Odločili smo se za uporabo 1 mM LeuLeuOMe, saj je bila DEVD-azna aktivnost pri tej koncentraciji najvišja. Ker smo hoteli natančneje raziskati vlogo cisteinskih katepsinov v procesu apoptoze sprožene z LeuLeuOMe, smo uporabili tudi različne inhibitorje. Uporabili smo inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d in inhibitor kaspaz z-VAD-fmk. Znano je, da lahko inhibitor E-64d inhibira tudi kalpaine, ki tudi lahko sodelujejo v procesu apoptoze (Gil-Parrado et al., 2002). Čeprav je bilo v celicah HeLa pokazano, da sprožitev apoptoze z LeuLeuOMe ne vključuje kalpainov (Cirman et al., 2004), smo vseeno preverili, če je apoptoza v našem celičnem modelu res odvisna le od cisteinskih katepsinov. Zato smo uporabili tudi inhibitor kalpainov AC27P. Ker smo hoteli preveriti, če so tudi druge proteaze vključene v apoptozo sproženo z LeuLeuOMe, smo uporabili še inhibitor aspartatne proteaze katepsina D pepstatin A. Iz slike 12 A vidimo, da je uporaba inhibitorja AC27P izključila vlogo kalpainov pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe na celični liniji HaCaT, saj inkubacija celic s tem inhibitorjem ni vplivala na DEVD-azno aktivnost. Kljub temu, da je bilo pokazano, da lahko tudi aspartatna proteaza katepsin D sodeluje pri apoptozi sproženi predvsem s TNF- $\alpha$  (Heinrich et al., 2004), in stavrosporinom (Bidere et al., 2003), smo pokazali, da ne sodeluje pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe. Podobno kot

inkubacija celic z inhibitorjem AC27P, tudi inkubacija celic z inhibitorjem katepsina D pepstatinom A ni preprečila povišanja DEVD-azne aktivnosti (Slika 12 A). Tudi na vrsto drugih celičnih linijah je bilo pokazano, da je vloga kalpainov in katepsina D pri apoptozi sproženi z leuLeuOMe izključena (Droga-Mazovec et al., 2008).

Apoptoza sprožena z LeuLeuOMe je na celični liniji HaCaT povzročila delno poškodbo lizosomov (Slika 13), sprostitvev katepsina L v citosol (Slika 14), poškodbo zunanje mitohondrijske membrane (Slika 16), sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev (Slika 18 A), DEVD-azno aktivnost (Slika 12 A), cepitev proteina PARP (Slika 18 B) ter izpostavitve fosfatidilserina na zunanjo membrano (Slika 12 B). Inkubacija celic z E-64d je večino teh sprememb preprečila (Slika 12 A, Slika 12 B, Slika 15, Slika 16, Slika 18 A in Slika 18 B), ni pa preprečila poškodbe lizosomov in sprostitvev katepsina L v citosol (Slika 13 in Slika 14). Inkubacija celic z z-VAD-fmk pa je preprečila DEVD-azno aktivnost (Slika 12 A), izpostavitvev fosfatidilserina na zunanjo membrano (Slika 12 B) ter cepitev molekule PARP (Slika 18 B). S pomočjo rezultatov dobljenih v prisotnosti inhibitorjev in brez njih sklepamo, da se pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe v celični liniji HaCaT katepsini aktivirajo pred kaspazami in, da je tako sprožena apoptoza od kaspaz odvisna. Do podobnih sprememb in rezultatov pri apoptozi sproženi z LeuleuOMe je prišlo tudi na vrsti drugih celičnih linijah (Droga-Mazovec et al., 2008). Podobne ugotovitve, ki vključujejo delno poškodbo lizosomske membrane, ki ji sledi poškodba mitohondrijske membrane in posledična aktivacija kaspaze-3, so bile opažene tudi z različnimi lizosomotropnimi dražljaji v različnih celičnih modelih, kot npr. pri apoptozi sproženi z UV v mišjih rakastih celicah jeter 1c1c7 (Reiners et al., 2002), s hidroklorokinom, ciprofloksacinom ali s norfloksacinom v celicah HeLa, Jurkat in različnih mišjih embrionalnih fibroblastih (Boya et al., 2003a,b) in z reaktivnimi kisikovimi molekulami v nevtrofilcih (Blomgram et al., 2007). Vsi ti rezultati nam povedo, da je mehanizem sprožitve apoptoze z lizosomotropnimi dražljaji, ki vodijo v sprostitvev katepsinov v citosol, vsaj delno ohranjen ne glede na celično linijo.

Destabilizacija lizosomov je *in vitro* (Stoka et al., 2001) in *ex vivo* v različnih celičnih modelih povzročila cepitev proteina Bid s katepsini, čemur so sledili sproščanje citokroma c in aktivacija kaspaze-3 (Stoka et al., 2001; Reiners et al., 2002; Cirman et al., 2004; Blomgram et al., 2007). Podobno smo tudi na našem celičnem modelu pokazali, da se po destabilizaciji lizosomov sproženi z LeuLeuOMe, protein Bid cepi v 15 kDa velik fragment (Slika 15). Da so katepsini odgovorni za cepitev proteina Bid pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe, smo potrdili z uporabo inhibitorja E-64d. Inkubacija celic z inhibitorjem E-64d je cepitev proteina Bid preprečila (Slika 15). Cepitev proteina Bid pri apoptozi sproženi z LeuleuOMe je bila zaznana tudi na številnih drugih celičnih modelih (Droga-Mazovec et al., 2008). Da je Bid pomemben povezovalni člen med lizosomi in mitohondriji pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe, je bilo pokazano tudi na mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za Bid. V celicah z izbitim genom za Bid je bil odstotek apoptotskih celic manjši in DEVD-azna aktivnost nižja v primerjavi s celicami divjega tipa. Prav tako je bilo v celicah z izbitim genom za Bid manj celic s poškodovanimi mitohondriji kot v celicah divjega tipa (Lea Bojič, doktorska disertacija). Vendar pa cepitev proteina Bid s katepsini ni nujno edina pot sprožitve apoptoze. Pri progresivni monoklonski epilepsiji (EPMI) v cerebelumu miši z izbitima genoma za stefin B in Bid so celice še vedno umirale za apoptozo. Pokazana je bila delna apoptoza Purkinje celic, delna apoptoza granulozne plasti, atrofija malih možganov ter slepota (Houseweart et al., 2003b). Prav tako ni bilo moč zaznati cepitve proteina Bid pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe na embrionalnih ledvičnih celicah HEK293 (Droga-Mazovec et al., 2008). Tako smo želeli dodatno preveriti ali so lahko tudi antiapoptotski proteini poleg proapoptotskega proteina Bid, substrati katepsinov med apoptozo sproženo z LeuLeuOMe. Tako smo poleg cepitve proteina Bid zaznali tudi razgradnjo antiapoptotskega proteina Bcl-xL (Slika 17). Inkubacija celic z z-VAD-fmk na razgradnjo ni imela nobenega vpliva, inhibitor E-64d pa je razgradnjo proteina Bcl-xL popolnoma preprečil (Slika 17). Razgradnja antiapoptotskih proteinov iz družine Bcl-2 pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe je bila opažena tudi na drugih celičnih modelih. Tako je bila opažena razgradnja Bcl-2 na celičnem modelu SH-SY5Y, MCF-7 in HeLa, razgradnja Bcl-xL na celičnem modelu CaCo-2 in NHDF ter razgradnja Mcl-1 na celičnem modelu MCF-7 in SH-SY5Y (Droga-Mazovec et al., 2008).

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko predpostavimo naš model sprožitve apoptoze z LeuLeuOMe (Slika 40). Po poškodbi lizosomske membrane se v citosol sprostijo katepsini, ki cepijo Bid ali razgrajujejo antiapoptotske proteine iz družine Bcl-2. Temu sledi poškodba zunanje mitohondrijske membrane, sprostitvev citokroma c, aktivacija kaspaz in posledično apoptoza. Nadalje, katepsini lahko razgrajujejo tudi XIAP in na ta način ojačijo apoptotski signal tudi še po poškodbi zunanje mitohondrijske membrane. Vsekakor je to zelo poenostavljen model, saj katepsini najverjetneje cepijo ali razgrajujejo še vrsto drugih proteinov med apoptozo sproženo z destabilizacijo lizosomov.



Slika 40. Predlagan model sprožitve apoptoze z lizosomskimi proteazami po destabilizaciji lizosomov z *LeuLeuOMe*. Pri destabilizaciji lizosomske membrane se v citosol sprostijo katepsini, ki lahko cepijo Bid ali pa razgradijo antiapoptotske proteine kot so Bcl-2, Bcl-xL ali Mcl-1. Poleg teh proteinov lahko razgradijo tudi XIAP. To vodi v izekanje citokroma c iz mitohondrijev in posledično aktivacijo kaspaz ter apoptozo (Droga-Mazovec et al., 2008).



## 5.2 Sprožitve apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L

Predhodne študije so pokazale, da do destabilizacije lizosomske membrane in sproščanja katepsinov v citosol prihaja tudi pri apoptozi sproženi preko receptorjev smrti (Guicciardi et al., 2000; Werneburg et al., 2002; Werneburg et al., 2004). Kljub temu da mehanizmi, ki vodijo do destabilizacije lizosomske membrane še niso povsem razjasnjeni, več avtorjev trdi, da je poškodba lizosomov zgodnji dogodek pri tem modelu celične smrti. Poškodbi lizosomov sledi poškodba mitohondrijev ter posledična aktivacija kaspaze-3 in celična smrt (Guicciardi et al., 2000; Kagedal et al., 2001a,b; Werneburg et al., 2002; Fehrenbacher et al., 2004). Aktivacija receptorja TNF-R lahko sproži od kaspaz odvisno ali od kaspaz-neodvisno celično smrt. V imortaliziranih in transformiranih fibroblastih ter številnih tumorskih celičnih linijah, inhibicija kaspaz ni preprečila programirane celične smrti (Foghsgaard et al., 2001; Vercammen et al., 2001). Pokazano je tudi bilo, da imajo cisteinski lizosomski katepsini predvsem katepsin B, pomembno vlogo pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$  in TRAIL (Guicciardi et al., 2000; Foghsgaard et al., 2001; Werneburg et al., 2002; Nagaraj et al., 2007). Pri apoptozi sproženi z anti Fas JO-2 protitelesi na mišjih dermalnih fibroblastih pa smo pokazali, da pride do destabilizacije lizosomov šele po destabilizaciji mitohondrijske membrane ter, da katepsin B nima nobenega vpliva na potek apoptoze v tem celičnem modelu (Bojič et al., 2007). Prav tako je Vasiljeva s sodelavci pokazala, da katepsin B nima ključne vloge pri apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$  v primarnih tumorskih celicah PyMT, čeprav je bil pomemben pri apoptozi sproženi z LeuLeuOMe na istih celicah (Vasiljeva et al., 2008).

Z namenom raziskovanja vloge lizosomov oziroma mehanizma poškodbe lizosomske membrane ter vloge katepsina B in katepsina L na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in na celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L, smo apoptozo sprožili s TNF- $\alpha$ /CHX. Vezava liganda na receptor TNF-R sproži apoptozo le v primeru, ko je aktivacija NF- $\kappa$ B zavrnjena, t.j. ob inhibiciji proteinske sinteze (Wajant et al., 2003), zato smo v naših eksperimentih uporabljali inhibitor proteinske sinteze cikloheksimid (CHX) v končni koncentraciji 1  $\mu$ g/ml CHX. Za uporabo CHX pri tej koncentraciji smo se odločili na osnovi naših predhodnih rezultatov dobljenih na mišjih primarnih dermalnih fibroblastih (Bojič et al., 2007), kjer omenjena koncentracija ni bila toksična za celice in je sprožila apoptozo s TNF- $\alpha$ . Najprej smo celice inkubirali z različnimi koncentracijami TNF- $\alpha$  v prisotnosti CHX 14 ur, saj je bila optimizacija potrebna iz istega razloga kot pri uporabi kemikalije LeuLeuOMe. Iz slike 19 vidimo, da je bila pri koncentraciji 100 ng/ml TNF- $\alpha$  DEVD-azna aktivnost najvišja, pri višjih koncentracijah TNF- $\alpha$ /CHX pa je DEVD-azna aktivnost začela upadati in so celice najverjetneje že začele umirati z nekrozo. Nadalje smo tudi preverili kako sama inkubacija celic z 1  $\mu$ g/ml CHX ali s TNF- $\alpha$  pri koncentraciji 100 ng/ml vpliva na odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic. Na sliki 20 vidimo, da sam CHX kot tudi sam TNF- $\alpha$  ne vplivata na odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic, se pa dovzetnost celic za apoptozo močno poveča, če TNF- $\alpha$  dodamo CHX. Ker smo hoteli na našem modelu natančneje raziskati vlogo cisteinskih katepsinov v procesu apoptoze sprožene s TNF- $\alpha$ /CHX, smo uporabili tudi inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d in inhibitor kaspaz z-VAD-fmk. Iz slike 20 vidimo, da nam je inkubacija celic z inhibitorjem kaspaz zmanjšala odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic za približno 60 odstotkov v primerjavi s celicami, ki smo jih inkubirali samo s TNF- $\alpha$ /CHX. Inhibitor E-64d pa je odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic zmanjšal za 40 odstotkov. Čeprav tudi katepsini na našem celičnem modelu pomembno prispevajo k sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX, smo ugotovili, da je apoptoza pretežno odvisna od kaspaz. Aktivacija receptorja TNF-R povzroči aktivacijo prokaspaze-8, aktivna kaspaza-8 pa lahko ali aktivira izvršitvene kaspaze ali pa v celicah tipa II, cepi protein Bid (Scaffidi et al., 1998). Ker so mišji embrionalni fibroblasti celice tipa II, smo izvedli imunodetekcijo cepljene oblike proteina Bid v prisotnosti CHX, TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ /CHX ter v prisotnosti inhibitorjev, z-VAD-fmk in E-64d, da bi potrdili vpletenost mitohondrijev v apoptozi sproženi s TNF- $\alpha$  na našem celičnem modelu. Cepljeno obliko molekule Bid smo zaznali v celicah, ki smo jih inkubirali s TNF- $\alpha$ /CHX ter v celicah, ki smo jim predhodno dodali inhibitor E-64d (Slika 21). Inkubacija celic z z-VAD-fmk je to cepitev preprečila (Slika 21), kar nam je dodatno potrdilo dejstvo, da je apoptoza sprožena preko TNF receptorja v našem celičnem modelu pretežno odvisna od kaspaz. Sam CHX in sam TNF- $\alpha$  na cepitev proteina Bid nista imela vpliva (Slika 21). Naši rezultati so tako v skladu z večino študij, ki predlagajo, da so kaspaze glavne izvrševalke celične smrti pri apoptozi sproženi preko receptorjev smrti (Scaffidi et al., 1998; Ashkenazi and Dixit, 1999; Wajant et al., 2003; Ding and Yin, 2004).

Nadalje nas je zanimalo kdaj pride do poškodbe mitohondrijske membrane na našem celičnem modelu. Poškodbo mitohondrijske membrane smo spremljali z uporabo kemikalije MiToTracker Red CMX Ros in ugotovili, da pride do poškodbe mitohondrijev že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, tako v celicah divjega

tipa, kot v tistih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L (Slika 36). Odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji je v nadaljnjih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX samo še naraščal (Slika 36). Prav tako je po petih urah začel naraščati odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic tako v celicah divjega tipa kot v tistih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L (Slika 33). Po pet urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX smo tudi že opazili cepljeno obliko proteina Bid v vseh treh omenjenih celičnih linijah (Slika 23 in Slika 35). Opazili smo tudi, da je količina cepljene oblike proteina Bid v celicah divjega tipa naraščala s časom inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX (Slika 23).

Zanimalo nas je tudi kdaj se začne poškodba lizosomske membrane. Z uporabo kemikalije akridin oranž smo ugotovili, da se poškodba lizosomov začne šele po približno 11 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX tako v celicah divjega tipa kot v tistih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L (Slika 38). Ti rezultati so tako v nasprotju z rezultati nekaterih avtorjev, ki trdijo, da je poškodba lizosomov zgodnji dogodek v apoptozi sproženi preko receptorjev smrti (Guicciardi et al., 2000; Guicciardi et al., 2001; Foghsgaard et al., 2001; Fehrenbacher et al., 2004; Werneburg et al., 2004). So pa ti rezultati v skladu z našimi prejšnjimi rezultati dobljenimi na primarnih mišjih dermalnih fibroblastih pri apoptozi sproženi z Fas JO2 protitelesi (Bojič et al., 2007).

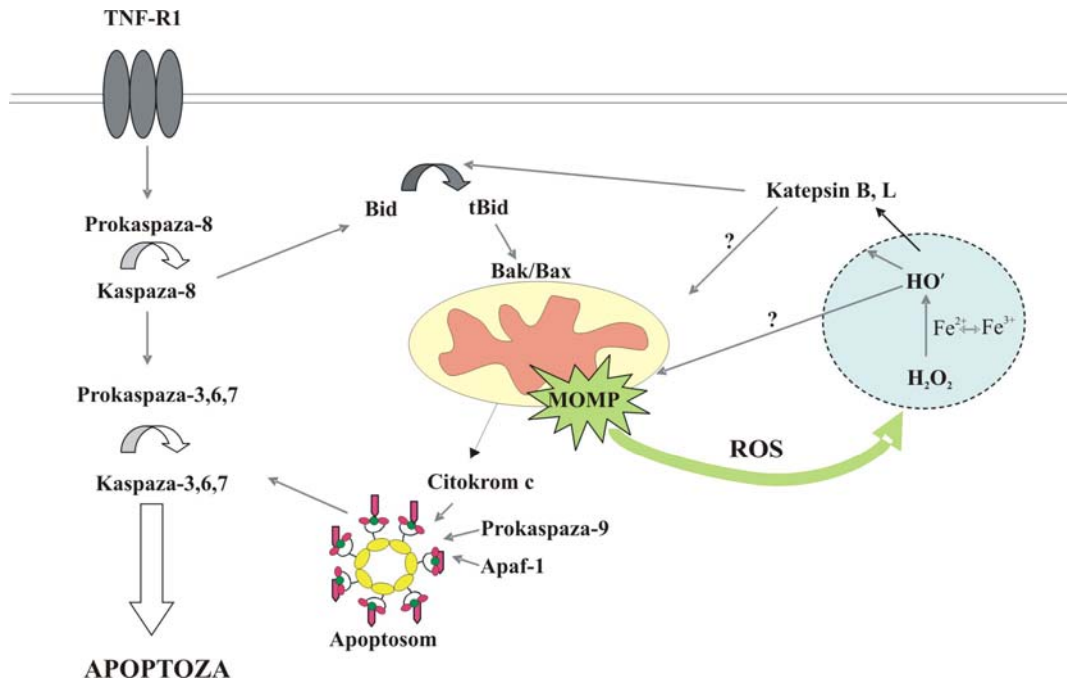
Natančni mehanizmi in signalne poti, ki povzročijo destabilizacijo lizosomske membrane še vedno niso povsem razjasnjene. Nekateri študije predlagajo, da lahko destabilizacijo lizosomskih membran povzroči znotrajcelični sfingozin (Kagedal et al., 2001b). Med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$  so opazili tvorbo večjih količin sfingozina ter poškodbo lizosomskih membran (Guicciardi et al., 2001). Nekateri avtorji celo trdijo, da je destabilizacija lizosomskih membran odvisna od kaspaze-8 (Guicciardi et al., 2000) ali kaspaze-9, ki se do sedaj še po neznanem mehanizmu aktivira neodvisno od apoptosoma (Gyrd-Hansen et al., 2006). Do sedaj še ni znano, kako lahko tako specifične proteaze kot so kaspaze destabilizirajo membrane sestavljene iz neproteinskih komponent. Nekateri drugi avtorji trdijo, da se lahko po sprožitvi apoptoze proapoptotski proteini iz družine Bcl-2 premestijo iz citosola v membrano lizosoma, kjer tvorijo pore na podoben način kot to počnejo na zunanji mitohondrijski membrani (Kagedal et al., 2005; Werneburg et al., 2007). Ta teorija sicer ni nemogoča, vendar še ni razjasnjeno kako bi proteini iz družine Bcl-2 tvorili pore na lizosomski membrane, če se preferenčno vežejo na zunanjo mitohondrijsko membrano (Chipuk et al., 2006; Kroemer et al., 2007). V nekaterih študijah se je tudi pokazalo, da lahko molekule znotraj lizosoma prispevajo k destabilizaciji membran. Odsotnost katepsina B v hepatocitih je zmanjšala obsežnost poškodbe lizosomskih membran med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ , kar kaže na možno vpletenost katepsinov tudi v procesu destabilizacije lizosomov (Baskin-Bey et al., 2005). Liu in sodelavci so ugotovili, da serinski proteazni inhibitor 2A (Spi2A), ki je dober inhibitor katepsina B, prav tako zmanjša destabilizacijo lizosomov (Liu et al., 2003). Naši rezultati na embrionalnih mišjih fibroblastih pa kažejo, da so za poškodbo lizosomske membrane odgovorne reaktivne kisikove zvrsti, ki nastanejo pri poškodbi mitohondrijske membrane. Nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti nismo zaznali po 3 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX, smo pa opazili več celic z višjo intenziteto zelene barve, oziroma nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v celicah, po šestih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX (Slika 26), t.j. po poškodbi mitohondrijske membrane. Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti smo zaznali tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B, prav tako po šestih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX (Slika 37). Z uporabo odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti, butiliranega hidroksianizola oz. BHA, ki odstranjuje reaktivne kisikove zvrsti predvsem znotraj mitohondrija smo potrdili, da so za poškodbo lizosomske membrane odgovorne reaktivne kisikove zvrsti (Slika 27). Inkubacija celic z omenjenim odstranjevalcem je bistveno zmanjšala število celic s poškodovanimi lizosomi ter tudi bistveno zmanjšala odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic in število celic s poškodovanimi mitohondriji (Slika 27 A, B in C). Manjše število celic s poškodovanimi lizosomi po inkubaciji celic s TNF- $\alpha$ /CHX smo opazili tudi z uporabo še enega odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti TEMPOLA (Slika 32), ki odstranjuje predvsem superoksidne anione na podoben način kot superoksid dismutaza (Khattab et al., 2006). Manjše število celic s poškodovanimi lizosomi smo opazili tudi v celicah, ki smo jim dodali desferoksamin ali DFO (Slika 32). DFO je kelator železovih ionov, ki se endocitira in transportira v lizosome ter tam ostane nepoškodovan in deluje kot past za omenjene ione (Tenopoulou et al., 2005). Uporaba kelatorja železovih ionov nakazuje, da reaktivne kisikove zvrsti med njimi najverjetneje vodikov peroksid, ki lažje od ostalih reaktivnih kisikovih zvrsti penetrira v lizosome, tvori s pomočjo železovih ionov preko Fentonove reakcije visoko toksičen hidroksilni radikal. Ta radikal je nadalje odgovoren za poškodbo lizosomske membrane. Tako se naši rezultati skladajo s teorijo, ki trdi, da oksidativni stres, ki skupaj z znotrajceličnim železom preko Fentonove reakcije povzroči tvorbo toksičnega hidroksilnega radikala, ki oksidira membranske lipide, povzroči destabilizacijo lizosomskih membran (Antunes et al., 2001; Dare et al., 2001; Persson et al., 2003).

Poškodba lizosomske membrane lahko povzroči dodatno poškodbo mitohondrijske membrane. Da pride do medsebojnega vpliva med lizosomi in mitohondriji na našem celičnem modelu, smo pokazali s pomočjo odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti BHA. Inkubacija celic v prisotnosti in odsotnosti BHA je tako

pokazala, da je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji v začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX naraščal tako v celicah, katerim smo predhodno dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali (Slika 28). Po daljšem času inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX, t.j. po poškodbi lizosomske membrane, se je ta odstotek ustalil v celicah, katerim smo predhodno dodali BHA, in še naprej naraščal v celicah, katerim BHA nismo dodali (Slika 28).

Po poškodbi lizosomske membrane se v citosol sprostijo katepsini, ki najverjetneje preko ojačitvene zanke še dodatno vplivajo na poškodbo mitohondrijske membrane. To je tudi najverjetnejša razlaga, da opazimo po poškodbi lizosomske membrane v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L manj celic s poškodovanimi mitohondriji (Slika 36), manjšo DEVD-azno aktivnost (Slika 34), kot tudi manjši odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic (Slika 33) v primerjavi s celicami divjega tipa. Pokazano je bilo, da lahko katepsini po sprostitvi iz lizosomov v citosol cepijo protein Bid v 15 kDa velik fragment (Stoka et al., 2001; Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008). Tako smo po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX izvedli imunodetekcijo cepljene oblike proteina Bid in opazili manj cepljene oblike tega proteina v celicah z izbitim genom za katepsin B v primerjavi s celicami divjega tipa (Slika 39). Protein Bid je torej substrat katepsinov na našem celičnem modelu apoptoze sprožene s TNF- $\alpha$ /CHX. Manj cepljene oblike proteina Bid v celicah z izbitim genom za katepsin B in katepsin L torej vpliva na manj celic s poškodovanimi mitohondriji, manjši odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic ter manjšo DEVD-azno aktivnost v teh celicah v primerjavi s celicami divjega tipa. Katepsin B je bolj stabilen pri nevtralnem pH in manj dovzeten za inhibicijo z endogenim inhibitorjem, cistatinom B (Turk et al., 1997) v primerjavi s katepsinom L. Iz tega bi namreč lahko sklepali, da ima katepsin B ključno vlogo pri cepitvi molekule Bid, in zato opazimo manj cepljene oblike proteina Bid v celicah z izbitim genom za katepsin B. Ni pa vedno Bid edini substrat katepsinov. Pokazano je bilo, da se je po aktivaciji receptorja TNF v hepatocitih divjega tipa in takih z izbitim genom za katepsin B protein Bid cepil (Werneburg et al., 2004). Po drugi strani, pa smo pokazali, da je bilo manj cepljene oblike proteina Bid v celicah z izbitim genom za katepsin B na mišjih primarnih dermalnih fibroblastih, ni pa katepsin B vplival na potek apoptoze sprožene z anti Fas JO-2 protitelesi (Bojič et al., 2007). Poleg proapoptotske molekule Bid, so lahko substrati katepsinov tudi antiapoptotski proteini, kar smo pokazali pri LeuLeuOMe sproženi apoptozi (Droga-Mazovec et al., 2008). Tako smo izvedli tudi imunodetekcijo antiapoptotskih proteinov Bcl-2 in Bcl-xL kot možnih substratov katepsinov. Žal nam jih ni uspelo detektirati, najverjetneje zaradi manjše ekspresije teh proteinov v naših celicah. Poleg omenjenih proteinov tudi ne moremo izključiti dejstva, da obstajajo še drugi do sedaj še neidentificirani substrati katepsinov, ki lahko sodelujejo pri dodatni poškodbi mitohondrijske membrane. In nenazadnje tudi ne moremo izključiti dejstva, da morebitne reaktivne kisikove zvrsti, ki nastanejo po poškodbi lizosomov, še dodatno pripomorejo k poškodbi mitohondrijske membrane. Uporaba odstranjevalca reaktivnih kisikovih zvrsti BHA je namreč zmanjšala odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji za približno 60 odstotkov in odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic za približno 70 odstotkov v primerjavi s celicami, katerim nismo dodali odstranjevalca (Slika 27 B in Slika 27 A). Obstajajo namreč tudi študije, ki predlagajo, da lizosomski destabilizaciji neposredno preko reaktivnih kisikovih zvrsti, sledi poškodba zunanje mitohondrijske membrane (Zhao et al., 2003).

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko predpostavimo naš model sprožitve apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih. Po vezavi liganda TNF- $\alpha$  na receptor pride do aktivacije kaspaze-8, cepitve molekule Bid in poškodbe zunanje mitohondrijske membrane. Pri poškodbi mitohondrijske membrane pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so odgovorne za poškodbo lizosomske membrane. Poškodba lizosomske membrane povzroči sprostitvev katepsinov v citosol, ki lahko s pomočjo dodatne cepitve proteina Bid še dodatno poškodujejo mitohondrijsko membrano. Da katepsini v našem celičnem modelu predstavljajo ojačitveno zanko med lizosomi in mitohondriji, smo potrdili na celicah z izbitim genom za katepsin B in katepsin L. Pot apoptoze je v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L do poškodbe lizosomske membrane potekala podobno kot v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa. Do razlik v apoptozi je med celicami divjega tipa in tistimi z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L prišlo šele po poškodbi lizosomov. Po poškodbi lizosomov tako opazimo v celicah z izbitim genom za katepsin B in katepsin L manjši odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic, manjšo DEVD-azno aktivnost, manj celic s poškodovanimi mitohondriji in manj cepljene oblike proteina Bid, v primerjavi s celicami divjega tipa (Slika 41).



Slika 41: Predlagan model sprožitve apoptoze s *TNF- $\alpha$ /CHX* v mišjih embrionalnih fibroblastih. Po vezavi liganda na receptor pride do aktivacije prokaspaze-8, aktivna kaspaza-8 cepi protein Bid, cepljena oblika proteina Bid pa povzroči poškodbo zunanje mitohondrijske membrane (MOMP). Pri poškodbi mitohondrijske membrane pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so odgovorne za poškodbo lizosomske membrane. Po poškodbi lizosomske membrane se v citosol sprostijo katepsini, ki z dodatno cepitvijo proteina Bid še dodatno poškodujejo mitohondrijsko membrano in tako predstavljajo ojačitveno zanko med lizosomi in mitohondriji.

## 6 Zaključki

Na človeški celični liniji HaCaT smo po poškodbi lizosomov, ki jo je povzročil LeuLeuOMe ugotovili, da lahko sproščeni katepsini cepijo Bid ali pa razgradijo antiapoptotski protein Bcl-xL. Temu sledi poškodba zunanje mitohondrijske membrane, sprostitvev citokroma c, aktivacija kaspaz, cepitev molekule PARP in posledično apoptoza.

Na mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L smo ugotovili, da pride po sprožitvi apoptoze s  $\text{TNF-}\alpha/\text{CHX}$  najprej do poškodbe zunanje mitohondrijske membrane. Poškodba mitohondrijske membrane povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so odgovorne za poškodbo lizosomske membrane. Poškodba lizosomske membrane povzroči sprostitvev katepsinov v citosol, ki s pomočjo dodatne cepitve proteina Bid še dodatno poškodujejo mitohondrijsko membrano. Na našem celičnem modelu je tako poškodba lizosomov po sprožitvi apoptoze s  $\text{TNF-}\alpha/\text{CHX}$  sekundarni dogodek in katepsini predstavljajo le ojačitveno zanko med lizosomi in mitohondriji.



## 7 Zahvale

Rada bi se zahvalila vsem, ki ste na kakršenkoli način prispevali, vplivali ali kakorkoli drugače zaznamovali mojo življensko pot v času nastajanja tega dela.

**Največja zahvala** gre vsekakor mojima mentorjema, **prof. dr. Vitu Turku** in **prof. ddr. Borisu Turku**, ki sta me vzela v njuno raziskovalno skupino na Institutu Jožef Stefan, in mi na ta način omogočila, da je to delo sploh začelo nastajati. Prof. dr. Vitu Turku iskrena hvala za njegov vedno veder osebni pristop, prijazen odziv in za vse strokovne napotke. Še posebej hvala tudi prof ddr. Borisu Turku, da me je pred tremi leti prepričal, da nadaljujem, in rečem da priložnosti.

Hvala vsem članom komisije, prof. dr. Vitu Turku, doc. dr. Evi Žerovnik in doc. dr. Veroniki Stoka za zelo natančen pregled doktorskega dela in mnoge odlične predloge in komentarje.

Hvala vsem bivšim in zdajšnjim sodelavcem ter prijateljem iz vseh treh odsekov za pomoč, druženje in prijetno vzdušje v laboratoriju. Predvsem hvala **Lei**, za iskreno prijateljstvo in nesebično pomoč, kadarkoli in kjerkoli sem jo potrebovala.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Petru Vandenabeelu iz Belgije (University of Ghent) ter prof. dr. Christophu Petersu in prof. dr. Thomasu Reinhecklu iz Nemčije (Albert Ludwigs University) za ves darovani material za naše poskuse.

In nenazadnje, hvala tudi vsem mojim najbližjim, tatu, mami, Andreju in vsem ostalim za njihovo brezpogojno ljubezen in podporo.

**Tata**, vedi, da me spomin nate vodi v vsem, kar delam, in vedno boš v mojem srcu. Tu mi preprosto zmanjka besed, s katerimi bi ti izrazila svojo hvaležnost za tvojo ljubezen, skrb, podporo in svobodo, da sem to, kar sem. Pogrešam te, pogrešam najine pogovore in tvoje modre nasvete.



## 8 Literatura in viri

- Abrahamson, M.; Barrett, A.J.; Salvesen, G.; Grubb, A. Isolation of Six Cysteine Proteinase Inhibitors from Human Urine. *J Biol Chem.* **261**, 11282–11289 (1986).
- Acehan, D.; Jiang, X.; Morgan, D.G.; Heuser, J.E.; Wang, X.; Akey, C.W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* **9**, 423-432 (2002).
- Adams, J.M.; Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
- Antonsson, B.; Montessuit, S.; Lauper, S.; Eskes, R.; Martinou, J.C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.* **345**, 271-278 (2000).
- Antunes, F.; Cadenas, E.; Brunk, U.T. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J.* **356**, 549-555 (2001).
- Ashkenazi, A.; Dixit V.M. Death receptors: signalling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
- Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* **11**, 255-260 (1999).
- Bahr, B.A.; Bendiske, J. The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *J Neurochem.* **83**, 481-489 (2002).
- Barrett, A.J.; Fritz, H.; Grubb, A.; Isemura, S.; Jarvinen, M.; Katunuma, N.; Machleidt, W.; Muller-Esterl, W.; Sasaki, M.; Turk, V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J.* **236**, 312 (1986).
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F., Eds. Handbook of proteolytic enzymes, Vol.1. Cathepsin D and E. Academic Press, p. 43 (2004a).
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F., Eds. Handbook of proteolytic enzymes, Vol.1. Cathepsin E and E. Academic Press, p. 33 (2004a).
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F., Eds. Handbook of proteolytic enzymes, Vol.2. Cathepsin G. Academic Press, p. 1542 (2004b).
- Basanez, G.; Sharpe, J.C.; Galanis, J.; Brandt, T.B.; Hardwick, J.M.; Zimmerberg, J. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem.* **277**, 49360-49365 (2002).
- Baskin-Bey, E.S.; Canbay, A.; Bronk, S.F.; Werneburg, N.; Guicciardi, M.E.; Nyberg, S.L.; Gores, G.J. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **288**, G396-G402 (2005).
- Berdowska, I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta.* **342**, 41-69 (2004).
- Berg, T.; Gjøen, T.; Bakke, O. Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J.* **307**, 313-326 (1995).
- Bidere, N.; Lorenzo, H.K.; Carmona, S.; Laforge, M.; Harper, F.; Dumont, C.; Senik, A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective AIF relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* **278**, 31401-31411 (2003).
- Bjork, I.; Nordling, K.; Raub-Segall, E.; Hellman, U.; Olson, S.T. Inactivation of papain by antithrombin but to autolytic digestion: a model of serpin inactivation of cysteine proteinases. *Eur J Biochem.* **335**, 701-709 (1998).
- Blomgran, R.; Zheng, L.; Stendahl, O. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol.* **81**, 1213-1223 (2007).
- Boatright, K.M.; Salvesen, G.S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* **15**, 725-731 (2003).

- Boatright, K.M.; Renatus, M.; Scott, F.L.; Sperandio, S.; Shin, H.; Pedersen, I.M.; Ricci, J.-E.; Edris, W.A.; Sutherlin, D.P.; Green, D.R.; Salvesen, G.S. A Unified Model for Apical Caspase Activation. *Mol Cell* **11**, 529–541 (2003).
- Boehning, D.; Patterson, R.L.; Sedaghat, L.; Glebova, N.O.; Kurosaki, T.; Snyder, S.H. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 1051-1061 (2003).
- Bojič, L.; Petelin, A.; Stoka, V.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Turk, V.; Turk, B. Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. *FEBS Lett* **581**, 5185-5190 (2007).
- Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* **39**, 615–647 (2003).
- Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707-716 (1973).
- Boya, P.; Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**, 6434-6451 (2008).
- Boya, P.; Andreau, K.; Poncet, D.; Zamzani, N.; Perfettini, J.L.; Metivier, D.; Ojcius, D.M.; Jäättelä, M.; Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exper Med* **197**, 1323-1334 (2003a).
- Boya, P.; Gonzalez-Polo, R.A.; Poncet, D.; Andreau, K.; Vieira, H.L.A.; Roumier, T.; Perfettini, J.L.; Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* **22**, 3927-3936 (2003b).
- Brix, K.; Lemansky, P.; Herzog, V. Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* **137**, 1963-1974 (1996).
- Brunk, U.T.; Neuzil, J.; Eaton, J.W. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep* **6**, 91-97 (2001).
- Bump, N.J.; Hackett, M.; Hugunin, M.; Seshagiri, S.; Brady, K.; Chen, P.; Ferenz, C.; Franklin, S.; Ghayur, T.; Li, P.; et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* **269**, 885-888 (1995).
- Bursch, W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**, 569-581 (2001).
- Campo, E.; Munoz, J.; Miquel, R.; Palacin, A.; Cardesa, A.; Sloane, B.F.; Emmert-Buck, M.R. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* **145**, 301-309 (1994).
- Canbay, A.; Guicciardi, M.E.; Higuchi, H.; Feldstein, A.; Bronk, S.F.; Rydzewski, R.; Taniai, M.; Gores, G.J. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* **12**, 152-159 (2003).
- Castiglioni, T.; Merino, M.J.; Elsner, B.; Lah, T.T.; Sloane, B.F.; Emmert-Buck, M.R. Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer. *Hum Pathol* **25**, 857-862 (1994).
- Chang, D.W.; Ditsworth, D.; Liu, H.; Srinivasula, S.M.; Alnemri, E.S.; Yang, X. Oligomerization Is a General Mechanism for the Activation of Apoptosis Initiator and Inflammatory Procaspases. *J Biol Chem* **278**, 16466–16469 (2003).
- Chapman, H.A.; Riese, R.J.; Shi, G.-P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* **59**, 63–88 (1997).
- Chen, G.; Goeddel, D.V. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* **296**, 1634–1635 (2002).
- Chen, J.M.; Rawlings, N.D.; Stevens, R.A.; Barrett, A.J. Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett* **441**, 361-365 (1998).
- Chen-Levy, Z.; Cleary, M.L. Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem* **265**, 4929-4933 (1990).
- Chen, M.; He, H.; Zhan, S.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Gottlieb, R.A. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* **276**, 30724-30728 (2001).
- Chinnaiyan, A.M.; O'rouke, K.; Tewari, M.; Dixit, V.M. FADD, a novel death domain-containing protein interacts with the death domain of FAS and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
- Chipuk, J.E.; Bouchier-Hayes, L.; Green, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during

- apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* **13**, 1396-1402 (2006).
- Chou, J.J.; Li, H.; Salvesen, G.S.; Yuan, J.; Wagner, G. Solution Structure of BID, an Intracellular Amplifier of Apoptotic Signaling. *Cell* **96**, 615–624 (1999).
- Chowdhury, I.; Tharakan, B.; Bhat, G.K. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **151**, 10-27 (2008).
- Cirman, T.; Orešić, K.; Droga Mazovec, G.; Turk, V.; Reed, J.C.; Myers, R.M.; Salvesen, G.S.; Turk, B. 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 (2004).
- Claus, V.; Jahraus, A.; Tjelle, T.; Berg, T.; Kirsche, H.; Faulstich, H.; Griffiths, G.M. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 Macrophages: Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem.* **273**, 9842-9851 (1998).
- Creagh, E.M.; Murphy, B.M.; Duriez, P.J.; Duckett, C.S.; Martin, S.J. Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* **279**, 26906-26914 (2004).
- Cuozzo, J.W.; Tao, K.; Wu, Q.L.; Young, W.; Sahagian, G.G. Lysine-based structure in the proregion of procathepsin L is the recognition site for mannose phosphorylation. *J Biol Chem.* **270**, 15611-15619 (1995).
- Curtin, J.F.; Donovan, M.; Cotter, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods.* **265**, 49-72 (2002).
- Cygler, M.; Mort, J.S. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie.* **79**, 645-652 (1997).
- Danial, N.N.; Korsmeyer, S.J. Cell death: Critical control points. *Cell* **116**, 205-219 (2004).
- Daré, E.; Li, W.; Zhivotovsky, B.; Yuan, X.; Ceccatelli, S. Methylmercury and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radic Biol Med.* **30**, 1347-1356 (2001).
- Darmon, A.J.; Nicholson, D.W.; Bleackley, R.C. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **377**, 446-448 (1995).
- Datta, S.R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241 (1997).
- Deiss, L.P.; Galinka, H.; Berissi, H.; Cohen, O.; Kimchi, A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* **15**, 3861-3870 (1996).
- DeLa Cadena, R.A.; Colman, R.W. Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci.* **12**, 272-275 (1991).
- Demoz, M.; Castino, R.; Cesaro, P.; Baccino, F.M.; Bonelli, G.; Isidoro, C. Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNFalpha, not by etoposide, in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of cathepsin D. *Biol Chem.* **383**, 1237-1248 (2002).
- Deng, Y.; Lin, Y.; Wu, X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev.* **16**, 33-45 (2002).
- Deng, Y.; Ren, X.; Yang, L.; Lin, Y.; Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha induced apoptosis. *Cell* **115**, 61-70 (2003).
- Deveraux, Q.L.; Reed, J.C. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252 (1999).
- Ding, W.X.; Yin, X.M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* **8**, 445-454 (2004).
- Donepudi, M.; Mac Sweeney, A.; Briand, C.; Grütter, M.G. Insights into the Regulatory Mechanism for Caspase-8 Activation. *Mol Cell.* **11**, 543–549 (2003).
- Donovan, M.; Cotter, T.G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta.* **1644**, 133-147 (2004).
- Droga-Mazovec, G.; Bojič, L.; Petelin, A.; Ivanova, S.; Romih, R.; Repnik, U.; Salvesen, G.S.; Stoka, V.; Turk, V.; Turk, B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem.* **283**, 19140-19150 (2008).
- Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
- Dunn, A.D.; Crutchfield, H.E.; Dunn, J.T. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of

- cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem.* **266**, 20198-20204 (1991).
- Earnshaw, W.C.; Martins, L.M.; Kaufmann, S.K. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis: *Annu Rev Biochem.* **68**, 383-424 (1999).
- Eckelman, B.P.; Salvesen, G.S. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem.* **281**, 3254-3260 (2006).
- Eckelman, B.P.; Salvesen, G.S.; Scott, F.L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* **7**, 988-994 (2006).
- Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. A. caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
- Faubion, W.A.; Guicciardi, M.E.; Miyoshi, H.; Bronk, S.F.; Roberts, P.J.; Svingen, P.A.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest.* **103**, 137-145 (1999).
- Fehrenbacher, N.; Gyrd-Hansen, M.; Poulsen, B.; Felbor, U.; Kallunki, T.; Boes, M.; Weber, E.; Leist, M.; Jäättelä, M. Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. *Cancer Res.* **64**, 5301-5310 (2004).
- Felbor, U.; Kessler, B.; Mothes, W.; Goebel, H.H.; Ploegh, H.L.; Bronson, R.T.; Olsen, B.R. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *PNAS* **99**, 7883-7888 (2002).
- Feldstein, A.E.; Werneburg, N.W.; Canbay, A.; Guicciardi, M.E.; Bronk, S.F.; Rydzewski, R.; Burgart, L.J.; Gores, G.J. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* **40**, 185-194 (2004).
- Ferri, K.F.; Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* **3**, E255-E263 (2001).
- Fesik, S.W. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**, 273-282 (2000).
- Fischer, U.; Jänicke, R.U.; Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10**, 76-100 (2003).
- Foghsgaard, L.; Wissing, D.; Mauch, D.; Lademann, U.; Bastholm, L.; Boes, M.; Elling, F.; Leist, M.; Jäättelä, M. Cathepsin B Act as a Dominant Execution Protease in Tumor Cell Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *J Cell Biol.* **153**, 9999-1009 (2001).
- French, L.E.; Tschopp, J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ.* **10**, 117-123 (2003).
- Friedrichs, B.; Tepel, C.; Reinheckel, T.; Deussing, J.; von Figura, K.; Herzog, V.; Peters, C.; Saftig, P.; Brix, K. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest.* **111**, 1733-1745 (2003).
- Fuentes-Prior, P.; Salvesen, G.S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* **384**, 201-232 (2004).
- Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P.E.; Didelot, C.; Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **13**, 1423-1433 (2006).
- Gil-Parrado, S.; Fernández-Montalván, A.; Assfalg-Machleidt, I.; Popp, O.; Bestvater, F.; Holloschi, A.; Knoch, T.A.; Auerswald, E.A.; Welsh, K.; Reed, J.C.; Fritz, H.; Fuentes-Prior, P.; Spiess, E.; Salvesen, G.S.; Machleidt, W. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis: A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem.* **277**, 27217-27226 (2002).
- Gocheva, V.; Zeng, W.; Ke, D.; Klimstra, D.; Reinheckel, T.; Peters, C. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* **20**, 543-556 (2006).
- Green, D.R.; Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312 (1998).
- Green, D.R. Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629 (2004).
- Gross, A.; McDonnell, J.M.; Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911 (1999).
- Guicciardi, M.E.; Deussing, J.; Miyoshi, H.; Bronk, S.F.; Svingen, P.A.; Peters, C.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Cathepsin B contributes to TNF- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* **106**, 1127-1137 (2000).
- Guicciardi, M.E.; Miyoshi, H.; Bronk, S.F.; Gores, G.J. Cathepsin B Knockout Mice Are Resistant to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated Hepatocyte Apoptosis and Liver Injury. *Am J Pathol.* **159**, 2045-2054 (2001).

- Guicciardi, M.E.; Leist, M.; Gores, G.J. Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**, 2881-2890 (2004).
- Gyrd-Hansen, M.; Farkas, T.; Fehrenbacher, N.; Bastholm, L.; Høyer-Hansen, M.; Elling, F.; Wallach, D.; Flavell, R.; Kroemer, G.; Nylandsted, J.; Jäättelä, M. Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol Cell Biol.* **26**, 7880-7891 (2006).
- Halangk, W.; Lerch, M.M.; Brandt-Nedelev, B.; Roth, W.; Ruthenbueger, M.; Reinheckel, T.; Domschke, W.; Lippert, H.; Peters, C.; Deussing, J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest.* **106**, 773-781 (2000).
- Hanewinkel, H.; Glössl, J.; Kresse, H. Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. *J Biol Chem.* **262**, 12351-12355 (1987).
- Heinrich, M.; Neumeyer, J.; Jakob, M.; Hallas, C.; Tchikov, V.; Winoto-Morbach, S.; Wickel, M.; Schneider-Brachert, W.; Trauzold, A.; Hethke, A.; Schutze, S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* **11**, 550-563 (2004).
- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
- Hishita T.; Tada-Oikawa, S.; Tohyama, K.; Miura, Y.; Nishihara, T.; Tohyama, Y.; Yoshida, Y.; Uchiyama, T.; Kawanishi, S. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res.* **61**, 2878-2884 (2001).
- Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Milliman, C.; Schreiber, R.D.; Korsmeyer, S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336 (1990).
- Houseweart, M.K.; Pennacchio, L.A.; Vilaythong, A.; Peters, C.; Noebels, J.L.; Myers, R.M. Cathepsin B but not Cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonous epilepsy (EPM1). *J Neurosci.* **56**, 315-327 (2003a).
- Houseweart, M.K., Vilaythong, A.; Yin, X.-M.; Turk, B.; Noebels, J.L.; Myers, R.M. Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonous epilepsy (EPM1). *Cell Death Differ.* **10**, 1329-1335 (2003b).
- Ivanova, S.; Repnik, U.; Bojic, L.; Petelin, A.; Turk, V.; Turk, B. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol.* **442**, 183-199 (2008).
- Jäättelä, M.; Tschopp, J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol.* **4**, 416-423 (2003).
- Jäättelä, M.; Benedict, M.; Tewari, M.; Shayman, J.A.; Dixit, V.M. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* **10**, 2297-2305 (1995).
- Jiang, Y.; Woronicz, J.D.; Liu, W.; Goeddel, D.V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signalling by silencer of death domains. *Science* **283**, 543-546 (1999).
- Jin, Z.; El-Deiry, W. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* **4**, 139-163 (2005).
- Joyce, J.A.; Baruch, A.; Chehade, K.; Meyer-Morse, N.; Giraudo, E.; Tsai, F.Y.; Greenbaum, D.C.; Hager, J.H.; Bogoyo, M.; Hanahan, D. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**, 443-453 (2004).
- Jutras, I.; Reudelhuber, T.L. Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett.* **443**, 48-52 (1999).
- Kagedal, K.; Johansson, U.; Öllinger, K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* **15**, 1592-1594 (2001a).
- Kagedal, K.; Zhao, M.; Svensson, I.; Brunk, U.T. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J.* **359**, 335-343 (2001b).
- Kagedal, K.; Johansson, A.C.; Johansson, U.; Heimlich, G.; Roberg, K.; Wang, N.S.; Jürgensmeier, J.M.; Öllinger, K. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis-involvement of Bax? *Int J Exp Pathol.* **86**, 309-321 (2005).
- Kaufmann, S.H.; Hengartner, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* **11**, 525-534 (2001).
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**, 239-257 (1972).
- Khattab, M.M. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur J Pharmacol.* **548**, 167-173 (2006).

- Kluck, R.M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136 (1997).
- Kobayashi, Y.; Takasaki, A.; Kurosaka, K.; Sakurai, Y.; Iwamura, M.; Watanabe, N. Cell-Type Specificity of L-Leucyl-L-Leucine Methyl Ester. *Biochem Biophys Research Commun.* **272**, 687-690 (2000).
- Kothakota, S.; Azuma, T.; Reinhard, C.; Klippel, A.; Tang, J.; Chu, K.; McGarry, T.J.; Kirschner, M.W.; Kohts, K.; Kwiatkowski, D.J.; Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-298 (1997).
- Kroemer, G.; Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* **6**, 513-519 (2000).
- Kroemer, G.; Jäättelä, M. Lysosomes and autophagy in cell death. *Nat Rev Cancer.* **5**, 886-897 (2005).
- Kroemer, G.; Galuzzi, L.; Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* **87**, 99-163 (2007).
- Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; El-Deiry, W.S.; Golstein, P.; Green, D.R.; Hengartner, M.; Knight, R.A.; Kumar, S.; Lipton, S.A.; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M.E.; Tschopp, J.; Yuan, J.; Piacentini, M.; Zhivotovsky, B.; Melino, G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3-11 (2009).
- Krueger, A.; Schmitz, I.; Baumann, S.; Krammer, P.H.; Kirchhoff, S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* **276**, 20633-20640 (2001).
- Kuwana, T.; Mackey, M.R.; Perkins, G.; Ellisman, M.H.; Latterich, M.; Schneider, R.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D. Bid, Bax, lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331-342 (2002).
- Lah, T.T.; Kos, K. Cysteine Proteinases in Cancer Progression and Their Clinical Relevance for Prognosis. *Biol Chem.* **379**, 125-130 (1998).
- Leist, M.; Jäättelä, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 589-598 (2001a).
- Leist, M.; Jäättelä, M. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ.* **8**, 324-326 (2001b).
- Lenarčič, B.; Križaj, I.; Zunec, P.; Turk, V. Differences in specificity for the interactions of stefins A, B and D with cysteine proteinases. *FEBS Lett.* **395**, 113-118 (1996).
- Letai, A.; Bassik, M.C.; Walensky, L.D.; Sorcinelli, M.D.; Weiler, S.; Korsmeyer, S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-192 (2002).
- Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* **91**, 479-489 (1997).
- Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.; Yuan, J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
- Li, W.; Yuan, X.; Nordgren, G.; Dalen, H.; Dubowchik, G.M.; Firestone, R.A.; Brunk, U.T. Induction of cell death by lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett.* **470**, 35-39 (2000).
- Li, L.Y.; Luo, X.; Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
- Liu, X.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184 (1997).
- Liu, N.; Raja, S.M.; Zazzeroni, F.; Metkar, S.S.; Shah, R.; Zhang, M.; Wang, Y.; Bromme, D.; Russin, W.A.; Lee, J.C.; Peter, M.E.; Froelich, C.J.; Franzoso, G.; Ashton-Rickardt, P.G. NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *EMBO J.* **22**, 5313-5322 (2003).
- Lockshin, R.A.; Zakeri, Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol.* **14**, 727-733 (2002).
- Lockshin, R.A.; Zakeri, Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* **23**, 2766-2733 (2004).
- Loeffler, M.; Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* **256**, 19-26 (2000).
- Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates

- cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90 (1998).
- Mandic, A.; Viktorsson, K.; Strandberg, L.; Heiden, T.; Hansson, J.; Linder, S.; Shoshan, M.C. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* **22**, 3003-3013 (2002).
- Manna, S.K.; Zhang, H.J.; Yan, T.; Oberley, L.W.; Aggarwal, B.B. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem.* **273**, 13245-13254 (1998).
- Marzo, I.; Brenner, C.; Zamzami, N.; Susin, S.A.; Vieira, H.L.; Prevost, M.C.; Xie, Z.; Matsuyama, S.; Reed, J.C.; Kroemer, G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027-2031 (1998).
- Mattson, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**, 120-129 (2000).
- Mikhailov, V.; Mikhailova, M.; Degenhardt, K.; Venkatachalam, M.A.; White, E.; Saikumar, P. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem.* **278**, 5367-5376 (2003).
- Nagaraj, N.S.; Vigneswaran, N.; Zacharias, W. Hypoxia inhibits TRAIL-induced tumor cell apoptosis: involvement of lysosomal cathepsins. *Apoptosis* **12**, 125-139 (2007).
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
- Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **6**, 1028-1042 (1999).
- Nicholson, D.W.; Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* **22**, 299-306 (1997).
- Nylandsted, J.; Gyrd-Hansen, M.; Danielewicz, A.; Fehrenbacher, N.; Lademann, U.; Hoyer-Hansen, M.; Weber, E.; Multhoff, G.; Rohde, M.; Jäättelä, M. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exper Med.* **200**, 425-435 (2004).
- Okamura-Oho, Y.; Zhang, S.; Callahan, J.W.; Murata, M.; Oshima, A.; Suzuki, Y. Maturation and degradation of beta-galactosidase in the post-Golgi compartment are regulated by cathepsin B and a non-cysteine protease. *FEBS Lett.* **419**, 231-234 (1997).
- Pattingre, S.; Tassa, A.; Qu, X.; Garuti, R.; Liang, X.H.; Mizushima, N.; Packer, M.; Schneider, M.D.; Levine, B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1 dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939 (2005).
- Persson, H.L.; Yu, Z.; Tirosh, O.; Eaton, J.W.; Brunk, U.T. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med.* **34**, 1295-305 (2003).
- Pham, C.T.; Ley, T.J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *PNAS* **96**, 8627-8632 (1999).
- Philchenkov, A. Caspases: potential targets for regulation cell death. *J Mol Med.* **8**, 432-444 (2004).
- Puthalakath, H.; Strasser, A. Keeping keepers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* **9**, 505-551 (2002).
- Quan, L.T.; Tewari, M.; O'Rourke, K.; Dixit, V.; Snipas, S.J.; Poirier, G.G.; Ray, C.; Pickup, D.J.; Salvesen, G.S. Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *PNAS* **93**, 1972-1976 (1996).
- Ray, C.A.; Black, R.A.; Kronheim, S.R.; Greenstreet, T.A.; Sleath, P.R.; Salvesen, G.S.; Pickup, D.J. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell* **69**, 597-604 (1992).
- Rawlings, N.D.; Barrett, A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* **290**, 205-218 (1993).
- Reiners, Jr.J.J.; Caruso, J.A.; Mathieu, P.; Chelladurai, B.; Yin, X.-M.; Kessel, D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ.* **9**, 934-944 (2002).
- Reinheckel, T.; Deussing, J.; Roth, W.; Peters, C. Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem.* **382**, 735-741 (2001).
- Renatus, M.; Stennicke, H.R.; Scott, F.L.; Liddington, R.C.; Salvesen, G.S. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *PNAS* **98**, 14250-14255 (2001).
- Riedl, S.J.; Fuentes-Prior, P.; Renatus, M.; Kairies, N.; Krapp, S.; Huber, R.; Salvesen, G.S.; Bode, W.

- Structural basis for the activation of human procaspase-7. *PNAS* **98**, 14790–14795 (2001).
- Roberg, K.; Johansson, U.; Öllinger, K. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* **27**, 1228–1237 (1999).
- Rozman, J.; Stojan, J.; Kuhelj, R.; Turk, V.; Turk, B. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett.* **459**, 358-362 (1999).
- Saftig, P.; Hetman, M.; Schmahl, W.; Weber, K.; Heine, L.; Mossmann, H.; Koster, A.; Hess, B.; Evers, M.; von Figura, K.; Peters, C. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J.* **15**, 3599-3608 (1995).
- Sahara, S.; Aoto, M.; Eguchi, Y.; Imamoto, N.; Yoneda, Y.; Tsujimoto, Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**, 168-173 (1999).
- Salvesen, G.S.; Dixit, V.M. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-446 (1997).
- Salvesen, G.S.; Duckett, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 401-410 (2002).
- Scaffidi, C.; Fulda, S.; Srinivasan, A.; Friesen, C.; Li, F.; Tomaselli, K.J.; Debatin, K.M.; Krammer, P.H.; Peter, M.E. Two CD95 (Apo-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687 (1998).
- Schulze-Osthoff, K.; Ferrari, D.; Wesselborg, S.; Peter, M.E. Apoptosis signalling by death receptors. *Europ J Biochem.* **254**, 439-456 (1998).
- Shaulian, E.; Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* **4**, 131-136 (2002).
- Shi, G.P.; Villadangos, J.A.; Dranoff, G.; Small, C.; Gu, L.; Haley, K.J.; Riese, R.; Ploegh, H.L.; Chapman, H.A. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206 (1999).
- Shi, Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol.* **8**, 394-401 (2001).
- Shibata, M.; Kanamori, S.; Isahara, K.; Ohsawa, Y.; Konishi, A.; Kametaka, S.; Watanabe, T.; Ebisu, S.; Ishido, K.; Kominami, E.; Uchiyama, Y. Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun.* **251**, 199-203 (1998).
- Shimizu, S.; Tsujimoto, Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *PNAS* **97**, 577-582 (2000).
- Shimizu, S.; Konishi, A.; Kodama, T.; Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *PNAS* **97**, 3100-3105 (2000).
- Snipas, S.J.; Stennicke, H.S.; Riedl, S.; Potempa, J.; Travis, J.; Barrett, A.J.; Salvesen, G.S. Inhibition of distant caspase homologues by natural caspase inhibitors. *Biochem J.* **357**, 575–580 (2001).
- Srinivasula, S.M.; Saleh, A.; Ahmad, M.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. Isolation and assay of caspases. *Methods Cell Biol.* **66**, 1-27 (2001).
- Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449 (1995).
- Stennicke, H.R.; Salvesen, G.S. Caspases—controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta.* **1477**, 299-306 (2000).
- Stennicke, H.R.; Ryan, C.A.; Salvesen, G.S. Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci.* **27**, 94-101 (2002).
- Stoka, V.; Turk, B.; Schendel, S.L.; Kim, T.H.; Cirman, T.; Snipas, S.J.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; Freeze, H.; Abrahamson, M.; Bromme, D.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Yin, X.M.; Turk, V.; Salvesen, G.S. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem.* **276**, 3149-3157 (2001).
- Strasser, A.; O'Connor, L.; Dixit, V.M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* **69**, 217–245 (2000).
- Sukoh, N.; Abe, S.; Ogura, S.; Isobe, H.; Takekawa, H.; Inoue, K.; Kawakami, Y. Immunohistochemical study of cathepsin B. Prognostic significance in human lung cancer. *Cancer* **74**, 46-51 (1994).
- Takahashi, A. Caspase: executioner and undertaker of apoptosis. *Int J Hematol.* **70**, 226-232 (1999).
- Tao, K.; Stearns, N.A.; Dong, J.; Wu, Q.L.; Sahagian, G.G. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys.* **311**, 19-27 (1994).

- Tardy, C.; Codogno, P.; Autefage, H.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N. Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim Biophys Acta*. **1765**, 101-125 (2006).
- Temkin, V.; Huang, Q.; Liu, H.; Osada, H.; Pope, R.M. Inhibition of DP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Mol Cell Biol*. **101**, 2215-2225 (2006).
- Tenopoulou, M.; Doulias, P.T.; Barbouti, A.; Brunk, U.; Galaris, D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J*. **387**, 703-710 (2005).
- Thiele, D.L.; Lipsky, P.E. 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. *PNAS* **87**, 83-87 (1990).
- Thiele, D.L.; Lipsky, P.E. Apoptosis is induced in cells with cytolytic potential by L-leucyl-L-leucine methyl ester. *J Immunol*. **148**, 3950-3957 (1992).
- Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
- Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).
- Thornberry, N.A.; Bull, H.G.; Calaycay, J.R.; Chapman, K.T.; Howard, A.D.; Kostura, M.J.; Miller, D.K.; Molineaux, S.M.; Weidner, J.R.; Aunins, J.; et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774 (1992).
- Thornberry, N.A.; Rano, T.A.; Peterson, E.P.; Rasper, D.M.; Timkey, T.; Garcia-Calvo, M.; Houtzager, V.M.; Nordstrom, P.A.; Roy, S.; Vaillancourt, J.P.; Chapman, K.T.; Nicholson, D.W. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. **29**, 17907-17911 (1997).
- Timmer, J.C.; Salvesen, G.S. Caspase substrates. *Cell Death Differ*. **14**, 66-72 (2007).
- Tobin, D.J.; Foitzik, K.; Reinheckel, T.; Mecklenburg, L.; Botchkarev, V.A.; Peters, C.; Paus, R. The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol*. **160**, 1807-1821 (2002).
- Turk, B. Caspases: the central proteolytic machinery of apoptosis. *Futura (Stuttg., Hippokrates-Verl.)* **14**, 12-20 (1999).
- Turk, V.; Bode, W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*. **285**, 213-219 (1991).
- Turk, B.; Stoka, V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett*. **581**, 2761-2767 (2007).
- Turk, B.; Križaj, I.; Kralj, B.; Dolenc, I.; Popovič, T.; Bieth, J.G.; Turk, V. Bovine stefin C, a new member of the stefin family. *J Biol Chem*. **268**, 7323-7329 (1993).
- Turk, B.; Turk, V.; Turk, D. Structural and Functional Aspects of Papain-Like Cysteine Proteinases and Their Protein Inhibitors. *Biol Chem*. **378**, 141-150 (1997).
- Turk, D.; Gunčar, G.; Podobnik, M.; Turk, B. Revised Definition of Substrate Binding Sites of Papain-Like Cysteine Proteinases. *Biol Chem*. **379**, 137-147 (1998).
- Turk, B.; Turk, D.; Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*. **1477**, 98-111 (2000).
- Turk, V.; Turk, B.; Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*. **20**, 4629-4633 (2001).
- Turk, B.; Stoka, V.; Rozman-Pungerčar, J.; Cirman, T.; Droga-Mazovec, G.; Orešič, K.; Turk, V. Apoptotic Pathways: Involvement of Lysosomal Proteinases. *Biol Chem*. **383**, 1035-1044 (2002a).
- Turk, B.; Turk, D.; Salvesen, G.S. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers *Curr Pharm Des*. **8**, 1623-1637 (2002b).
- Turk, V.; Stoka, V.; Turk, D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci*. **13**, 5406-5420 (2008).
- Uchimoto, T.; Nohara, H.; Kamehara, R.; Iwamura, M.; Watanabe, N.; Kobayashi, Y. Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. *Apoptosis* **4**, 357-362 (1999).
- Vakkila, J.; Lotze, M. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol*. **4**, 641-648 (2004).
- Van Cruchten, S.; Van Den Broeck, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and

- necrosis. *Anat Histol Embryol.* **31**, 214-223 (2002).
- Vander Heiden, M.G.; Thompson, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* **1**, E209-E216 (1999).
- Vasiljeva, O.; Korovin, M.; Gajda, M.; Brodoefel, H.; Bojic, L.; Krüger, A.; Schurigt, U.; Sevenich, L.; Turk, B.; Peters, C.; Reinheckel, T. Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. *Oncogene* **27**, 4191-4199 (2008).
- Vaux, D.L.; Silke, J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 287-297 (2005).
- Vercammen, D.; Brouckaert, G.; Denecker, G.; Van de Craen, M.; Declercq, W.; Fiers, W.; Vandenabeele, P. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exper Med.* **188**, 919-930 (2001)
- Verhagen, A.M.; Silke, J.; Ekert, P.G.; Pakusch, M.; Kaufmann, H.; Connolly, L.M.; Day, C.L.; Tikoo, A.; Burke, R.; Wrobel, C.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J.; Vaux, D.L. HtrA2 Promotes Cell Death through Its Serine Protease Activity and Its Ability to Antagonize Inhibitor of Apoptosis Proteins. *J Biol Chem.* **277**, 445-454 (2002).
- Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death Differ.* **10**, 45-65 (2003).
- Walczak, H.; Krammer, P.H. The CD95 (Apo-1/Fas) and the TRAIL (Apo-2l) apoptosis systems. *Exper Cell Res.* **256**, 58-66 (2000).
- Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-2933 (2001).
- Welss, T.; Sun, J.; Irving, J.A.; Blum, R.; Smith, A.I.; Whisstock, J.C.; Pike, R.N.; von Mikecz, A.; Ruzicka, T.; Bird, P.I.; Abts, H.F. Hurlin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry* **42**, 7381-7389 (2003).
- Werneburg, N.W.; Guicciardi, M.E.; Bronk, S.F.; Gores, G.J. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **283**, G947-G956 (2002).
- Werneburg, N.; Guicciardi, M.E.; Yin, X.M.; Gores, G.J. TNF- $\alpha$ -mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **287**, G436-G443 (2004).
- Werneburg, N.W.; Guicciardi, M.E.; Bronk, S.F.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem.* **282**, 28960-28970 (2007).
- Wu, G.S.; Saftig, P.; Peters, C.; El-Deiry, W.S. Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene* **16**, 2177-2183 (1998).
- Zhao, M.; Brunk, U.T.; Eaton, J.W. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.* **509**, 399-404 (2001).
- Zhao, M.; Antunes, F.; Eaton, J.W.; Brunk, U.T. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem.* **270**, 3778-3786 (2003).

## Kazalo slik

Slika 1: <i>Značilnosti apoptotične in nekrotične celične smrti.</i> Apoptotska celica se skrči, jedro se zgosti. Tako odmrla celica ne izzove vnetne reakcije in jo naglo fagocitirajo in razgradijo sosednje celice predvsem makrofagi. Pri nekrozi pa celica nabrekne, počí in spusti vsebino v okoliško tkivo kar privede do vnetja (povzeto po Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).	1
Slika 2: <i>Shematska predstavitev kaspaz.</i> Proencim je sestavljen iz NH <sub>2</sub> terminalne prodomene (N-peptide), ki je vezana na veliko podenoto (p20; p17), ta se pa veže preko povezovalnega peptida na malo podenoto (p10; p12). Sprožitvene kaspaze imajo dolge prodomene, ki vsebujejo CARD ali DED domene, izvršitvene pa vsebujejo kratke prodomene (povzeto po Turk, 1999).	3
Slika 3: <i>Struktura aktivne kaspaze-3 v kompleksu z inhibitorjem.</i> Vidni sta dve veliki (modra in rumena) in dve mali (vijola in oranžna) podenoti. Vidno je tudi aktivno mesto (kroglice) (povzeto po Fesik, 2000).	3
Slika 4: <i>Pot apoptoze sprožena preko aktivacije receptorja FAS.</i> Vezava liganda FasL na receptor FAS povzroči njegovo trimerizacijo in združevanje domen smrti na znotrajcelični strani. Preko domen smrti se na receptor veže adaptor FADD. Molekula FADD vsebuje tudi domene DED preko katerih veže prokaspazo-8 in jo aktivira. Kaspaza-8 lahko sproži apoptozo ali preko aktivacije kaspaze-3 ali preko cepitve molekule Bid, ki sproži notranjo mitohondrijsko pot (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).	5
Slika 5: <i>Pot apoptoze sprožena preko receptorja TNF-R1.</i> Vezava liganda TNF na receptor TNF-R1 povzroči sprostitvev proteina SODD ter nastanek receptorskega kompleksa na citosolni strani, ki vsebuje pomembne adapterske molekule, kot so TRADD, TRAF-2, RIP in FADD. Na adaptorsko molekulo TRADD se lahko veže FADD, ki sproži aktivacijo prokaspaze-8 (-10) in posledično apoptozo. Na TRADD se lahko vežejo tudi adaptorski molekuli TRAF-2 in RIP. Vezava MAPKKK na TRAF2 sproži aktivacijo JNK. Protein RIP pa sodeluje pri aktivaciji transkripcijskega faktorja NF-κB, ki vpliva na izražanje številnih genov pomembnih za preživetje (povzeto po Jin and El-Deiry, 2005).	6
Slika 6: <i>Shematski prikaz aktivacije prokaspaze-9 na apoptosomu.</i> Po sprostitvi iz mitohondrija v citosol, se citokrom c veže z adapterskim proteinom Apaf-1 in z dATP/ATP. Konformacijska sprememba proteina Apaf-1 omogoči izpostavitvev domene CARD na katero se veže CARD domena prokaspaze-9. Nastali kompleks imenujemo apoptosom. V apoptosomu se prokaspaza-9 konformacijsko spremeni in aktivira (povzeto po Wang, 2001).	7
Slika 7: <i>Razdelitev proteinov iz družine Bcl-2 po funkciji in strukturi.</i> Proteine iz družine Bcl-2 delimo na antiapoptotske in proapoptotske. Proapoptotske delimo na dve podskupini, na proapoptotske proteine, sestavljene iz treh BH domen in na tiste, ki vsebujejo le regijo BH3 (povzeto po Gross et al., 1999).	9
Slika 8: <i>Mehanizmi poškodbe zunanje mitohondrijske membrane.</i> (A) Nastanek por s pomočjo proteinov iz družine Bcl-2. Interakcija Bax/Bak s tBid povzroči konformacijske spremembe na Bax/Bak, Bax se premesti na zunanjo mitohondrijsko membrano in oligomerizira. Nastali heterooligomeri lahko sami tvorijo pore v zunanji mitohondrijski membrani, kjer pride do iztekanja citokroma c. Bax/Bak pa lahko interagirata tudi z ostalimi proteini (VDAC) na zunanji mitohondrijski membrani, kjer prav tako pride do tvorbe por in izpusta proapoptotskih proteinov iz mitohondrija. (B) Odprtje PTP kompleksa. PTP kompleks je sestavljen iz VDAC na zunanji mitohondrijski membrani (OMM), iz ANT na notranji mitohondrijski membrani (IMM) ter iz ciklofilina D v matriksu. Odprtje PTP kompleksa povzroči padec mitohondrijskega membranskega potenciala. Proapoptotski proteini, kot sta Bax in Bak povzročijo odprtje PTP kompleksa, antiapoptotski pa njegovo zaprtje (povzeto po Donovan and Cotter, 2004).	10

Slika 9. Predlagani mehanizem medsebojnega vpliva med lizosomi in mitohondriji preko nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti. Pri apoptotskih dražljajih, ki sprožijo permeabilizacijo mitohondrijev in iztekanje citokroma c, pride do porušanja transporta elektronov, kar vodi v nastanek ROS. Vodikov peroksid, ki nastane v mitohondrijih, lahko difundira v lizosome, kjer preko Fentonove reakcije povzroči nastanek visoko toksičnega hidroksilnega radikala, ki povzroči poškodbo lizosomske membrane (povzeto po Brunk et al., 2001). .....	11
Slika 10. <i>Mehanizmi poškodbe lizosomske membrane.</i> Natančni mehanizmi poškodbe lizosomske membrane še niso povsem razjasnjeni, k destabilizaciji lizosomov pa lahko vodijo tako notranji (poškodba DNK, oksidativni stres, sfingozin, proteini iz družine Bcl-2, kaspaze, idr.) kot tudi zunanji (receptorji smrti, lizosomotropne snovi, stavrosporin, idr.) dražljaji (povzeto po Kroemer and Jäätelä, 2005; Boya and Kroemer, 2008). .....	16
Slika 11: <i>DEVD-azna aktivnost v popolnih celičnih lizatih celic HaCaT.</i> DEVD-azna aktivnost se je z naraščajočo koncentracijo LeuLeuOMe višala in dosegla najvišjo vrednost pri 1 mM LeuLeuOMe. Pri višjih koncentracijah LeuLeuOMe pa je bila opažena nižja aktivnost kaspaz.....	25
Slika 12: <i>DEVD-azna aktivnost in odstotek Annexin V-PE/7AAD pozitivnih celic v celicah HaCaT.</i> (A) Inhibitorja E-64d in z-VAD-fmk sta preprečila DEVD-azno aktivnost, AC275 in pepstatin A pa na aktivnost kaspaz nista vplivala. (B) Največ zgodnje/pozno apoptotskih celic opazimo pri celicah inkubiranih z LeuLeuOMe. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v celicah, katerim smo dodali inhibitorja E-64d in z-VAD-fmk pa je primerljiv s kontrolo. ....	26
Slika 13: <i>Odstotek celic HaCaT s poškodovanimi lizosomi po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe.</i> Do poškodbe lizosomov oz. nižje intenzitete zelene barve je prišlo v celicah inkubiranih z LeuLeuOMe in v celicah, katerim smo pred dodatkom LeuLeuOMe dodali tudi inhibitorja z-VAD-fmk ali E-64d. ....	27
Slika 14: <i>Imunodetekcija katepsina L med apoptozo sproženo z LeuLeuOMe.</i> Do sprostitve katepsina L v citosol je prišlo po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe. Niti inhibitor E-64d niti z-VAD-fmk tega puščanja nista preprečila. ....	27
Slika 15: <i>Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid med apoptozo sproženo z LeuLeuOMe v celicah HaCaT.</i> Po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe pride do cepitve proteina Bid v 15 kDa fragment. Prisotnost inhibitorja E-64d to cepitev popolnoma prepreči, z-VAD-fmk pa to cepitev prepreči le delno. ....	27
Slika 16: <i>Odstotek celic HaCaT s poškodovanimi mitohondriji po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe.</i> LeuLeuOMe povzroči poškodbo mitohondrijev v celicah, v katerih pride do nižje intenzitete rdeče barve. Inhibitor z-VAD-fmk na poškodbo mitohondrijev nima vpliva, prisotnost inhibitorja E-64d pa je poškodbo mitohondrijev preprečila.....	28
Slika 17: <i>Imunodetekcija proteina Bcl-xL in Mcl-1 po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe v celicah HaCaT.</i> Po dodatku LeuLeuOMe pride do razgradnje proteina Bcl-xL. Inhibitor z-VAD-fmk na razgradnjo proteina Bcl-xL ni imel vpliva, E-64d pa je to razgradnjo preprečil. Pri proteinu Mcl-1 pa ni prišlo niti do cepitve niti do razgradnje. ....	28
Slika 18: <i>Imunodetekcija citokroma c in cepljene oblike molekule PARP po sprožitvi apoptoze z LeuLeuOMe v celicah HaCaT.</i> (A) Do sprostitve citokroma c je prišlo v celicah, ki smo jim dodali LeuLeuOMe in LeuLeuOMe v kombinaciji z inhibitorjem z-VAD-fmk. (B) Cepljeno obliko molekule PARP smo zaznali le v celicah, ki smo jim dodali LeuLeuOMe. Prisotnost inhibitorjev z-VAD-fmk ali E-64d je cepitev molekule PARP preprečila.....	29
Slika 19: <i>DEVD-azna aktivnost v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po sprožitvi apoptoze s TNF<math>\alpha</math>/CHX.</i> DEVD-azna aktivnost je najvišja po 14 urni inkubaciji s 100 ng/ml TNF- $\alpha$ . Pri uporabi višjih koncentracij TNF- $\alpha$ pa je bila opažena nižja aktivnost kaspaz. ....	30
Slika 20: <i>Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po sprožitvi apoptoze s TNF-<math>\alpha</math>/CHX.</i> Največ zgodnje/pozno apoptotskih celic opazimo po sprožitvi apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX, sam CHX ali sam TNF- $\alpha$ pa na apoptozo nimata nobenega vpliva. Dodatek inhibitorja z-VAD-fmk je znižal odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic na 13.1, E-64d pa na 20.4. ....	30
Slika 21: <i>Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid po sprožitvi apoptoze s TNF-<math>\alpha</math>/CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa.</i> Do cepitve proteina Bid je prišlo v celicah inkubiranih s TNF- $\alpha$ /CHX in v celicah, ki smo jim dodali inhibitor E-64d. Inkubacija celic z inhibitorjem z-VAD-fmk pa je cepitev preprečila. ....	31

Slika 22: Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v prisotnosti TNF- $\alpha$ /CHX je s časom naraščal in po 14 urah dosegel 18.3 odstotkov zgodnje-apoptotskih celic in 15 odstotkov pozno-apoptotskih celic.....	31
Slika 23: Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do cepljene oblike proteina Bid pride že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. ....	32
Slika 24: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi mitohondriji po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do poškodbe mitohondrijske membrane je prišlo že po 5 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer je bilo 7.7 % svetlo rdečih celic oziroma celic s poškodovanimi mitohondriji. V nadaljnjih urah inkubacije je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji samo še naraščal. ....	32
Slika 25: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov s poškodovanimi lizosomi po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX. Do poškodbe lizosomske membrane je prišlo šele po približno 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer je odstotek svetlo rdečih celic, oziroma celic s poškodovanimi lizosomi začel šele naraščati, in dosegel vrednost 33% po 14 urni inkubaciji, po 16 urni inkubaciji pa že 45%. ....	32
Slika 26: Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX. Do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti pride po 6 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo več zelenofluorescirajočih celic. Tri urna inkubacija s TNF- $\alpha$ /CHX še ne povzroči nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti.....	33
Slika 27: Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic, odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji in odstotek celic s poškodovanimi lizosomi v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. (A) Predinkubacija celic z BHA povzroči manjši odstotek zgodnje/pozno-apoptotskih celic po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. (B) Odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji je manjši v celicah, katerim smo dodali BHA. (C) Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi je po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX manjši v celicah, katerim smo predhodno dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali. ....	34
Slika 28: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi mitohondriji po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. V začetnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji podoben tako v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah brez odstranjevalca. Po 10 urni inkubaciji pa je odstotek celic s poškodovanimi mitohondriji, katerim smo dodali odstranjevalec BHA precej manjši od odstotka celic s poškodovanimi mitohondriji, kjer odstranjevalca BHA nismo dodali. ....	35
Slika 29: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi lizosomi po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. Odstotek celic s poškodovanimi lizosomi narašča bistveno počasneje v celicah, katerim smo dodali BHA kot v celicah, katerih BHA nismo dodali. ....	36
Slika 30: Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic narašča bistveno počasneje v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah brez BHA. ....	37
Slika 31: DEVD-azna aktivnost v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa po 7 in 14 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti in odsotnosti BHA. DEVD-azna aktivnost je po 7 urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX podobna tako v celicah, katerim smo dodali BHA, kot v celicah, katerim BHA nismo dodali. Po 14 urah inkubacije pa je DEVD-azna aktivnost nižja v celicah, katerim smo dodali BHA, v primerjavi s celicami, katerim BHA nismo dodali. ....	38
Slika 32: Odstotek celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa s poškodovanimi lizosomi po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX v prisotnosti TEMPOLA in DFO. Tako kelator železovih ionov DFO kot tudi odstranjevalec reaktivnih kisikov zvrsti TEMPOL, zaščitita lizosomsko membrano pred poškodbo. ....	38

- Slika 33: *Primerjava odstotka zgodnje/pozno apoptotskih celic v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.* Odstotek zgodnje/pozno apoptotskih celic v začetnih urah inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX narašča zelo podobno tako v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L kot v celicah divjega tipa. Do vidnejših razlik v odstotku apoptotskih celic med celicami divjega tipa in tistimi z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L pa pride šele po daljšem času inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.....39
- Slika 34: *DEVD-azna aktivnost v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.* DEVD-azna aktivnost narašča s časom inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX tako v celicah divjega tipa kot v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L. Po daljšem času inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX pride do manjše DEVD-azne aktivnosti v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L v primerjavi s celicami divjega tipa. ....40
- Slika 35: *Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.* Cepljeno obliko proteina Bid opazimo že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX tako v celicah z izbitim genom za katepsin B kot tudi v celicah z izbitim genom za katepsin L.....40
- Slika 36: *Primerjava odstotka celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastov z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L s poškodovanimi mitohondriji po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.* Podobno kot v celicah divjega tipa se tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L poškodba mitohondrijev začne že po 5 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX. Do razlik v deležu celic s poškodovanimi mitohondriji med celicami divjega tipa in celicami z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L pride šele po 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L manj celic s poškodovanimi mitohondriji kot v celicah divjega tipa. ....41
- Slika 37: *Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B med apoptozo sproženo s TNF- $\alpha$ /CHX.* Do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti pride po 6 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX, kjer opazimo več zelenofluorescirajočih celic. Tri urna inkubacija s TNF- $\alpha$ /CHX še ne povzroči nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti. ....42
- Slika 38: *Primerjava odstotka celic mišjih embrionalnih fibroblastov divjega tipa in mišjih embrionalnih fibroblastov z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L s poškodovanimi lizosomi po različnih časih inkubacije s TNF- $\alpha$ /CHX.* Podobno kot v celicah divjega tipa se tudi v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L poškodba lizosomske membrane začne šele po približno 11 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX in odstotek celic s poškodovanimi lizosomi v vseh treh celičnih linijah primerljivo narašča s časom inkubacije. ....42
- Slika 39: *Imunodetekcija cepljene oblike proteina Bid v mišjih embrionalnih fibroblastih divjega tipa in v mišjih embrionalnih fibroblastih z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L po 14 urni inkubaciji s 50ng/ml in 100ng/ml TNF- $\alpha$ /CHX.* Po 14 urni inkubaciji s TNF- $\alpha$ /CHX opazimo manj cepljene oblike proteina Bid v celicah z izbitim genom za katepsin B ali katepsin L v primerjavi s celicami divjega tipa. ....43
- Slika 40: *Predlagan model sprožitve apoptoze z lizosomskimi proteazami po destabilizaciji lizosomov z LeuLeuOMe.* Pri destabilizaciji lizosomske membrane se v citosol sprostijo katepsini, ki lahko cepijo Bid ali pa razgradijo antiapoptotske proteine kot so Bcl-2, Bcl-xL ali Mcl-1. Poleg teh proteinov lahko razgradijo tudi XIAP. To vodi v izekanje citokroma c iz mitohondrijev in posledično aktivacijo kaspaz ter apoptozo (Droga-Mazovec et al., 2008). ....47
- Slika 41: *Predlagan model sprožitve apoptoze s TNF- $\alpha$ /CHX v mišjih embrionalnih fibroblastih.* Po vezavi liganda na receptor pride do aktivacije prokaspaze-8, aktivna kaspaza-8 cepi protein Bid, cepljena oblika proteina Bid pa povzroči poškodbo zunanje mitohondrijske membrane (MOMP). Pri poškodbi mitohondrijske membrane pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so odgovorne za poškodbo lizosomske membrane. Po poškodbi lizosomske membrane se v citosol sprostijo katepsini, ki z dodatno cepitvijo proteina Bid še dodatno poškodujejo mitohondrijsko membrano in tako predstavljajo ojačitveno zanko med lizosomi in mitohondriji. ....52

## Kazalo tabel

Tabela 1: *Razdelitev kaspaz glede na proces v katerem sodelujejo.* Kaspaze razdelimo na provnetne in proapoptotske. Proapoptoske pa razdelimo še v dve podskupini, sprožitvene in izvrševalne. .... 2



## Priloge

V času doktorske disertacije sta bila objavljena dva raziskovalna članka in en pregledni članek.

Bojič, L.; Petelin, A.; Stoka, V.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Turk, V.; Turk, B. Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. *FEBS Lett.* **581**, 5185-5190 (2007).

Droga-Mazovec, G.; Bojic, L.; Petelin, A.; Ivanova, S.; Romih, R.; Repnik, U.; Salvesen, G.S.; Stoka, V.; Turk, V.; Turk, B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem.* **283**, 19140-19150 (2008).

Ivanova, S.; Repnik, U.; Bojič, L.; Petelin, A.; Turk, V.; Turk, B. Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol.* **442**, 183-199 (2008)