

VLOGA KATEPSINA D PRI AOPTOZI SPROŽENI S TNF α IN MENADIONOM

Katja Bidovec

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: prof. dr. Veronika Stoka, Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

Somentor: akad. prof. dr. Vito Turk, Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. ddr. Boris Turk, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Ana Plemenitaš, članica, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Eva Žerovnik, članica, Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Katja Bidovec

VLOGA KATEPSINA D PRI AOPTOZI SPROŽENI S $\text{TNF}\alpha$ IN
MENADIONOM

Doktorska disertacija

ROLE OF CATHEPSIN D IN $\text{TNF}\alpha$ - AND MENADIONE-
INDUCED APOPTOSIS

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. dr. Veronika Stoka

Somentor: akad. prof. dr. Vito Turk

Ljubljana, Slovenija, januar 2018

Zahvala

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorici prof. dr. Veroniki Stoka za njeno vodstvo v času doktorskega študija. Hvala vam za vse ideje in obilo potrpljenja. Zahvaljujem se tudi somentorju akad. prof. dr. Vitu Turku, ki mi je omogočil delo na inštitutu in mi s tem odprl vrata v raziskovalni svet. Hvala vam za vse spodbudne besede in da ste verjeli vame.

Zahvaljujem se tudi dr. Iztoku Dolencu za izvedbo in vitro poskusov s kaspazami in stefinom B ter za vso ostalo pomoč, vključno s super vzdušjem v pisarni in odličnimi debatami.

Zahvala gre tudi članoma komisije prof. ddr. Borisu Turku, ki je bil več kot le to in mi dal marsikateri nepogrešljiv nasvet tekom doktorata. Hvala tudi dr. Ani Plemenitaš ter dr. Evi Žerovnik za strokovni pregled ter koristne nasvete pri oblikovanju doktorskega dela.

Iskrena zahvala gre prav vsem sodelavcem z odseka B1, še posebej pa Mojci, Ivici, Janji, Nežki ter Moniki. Vaša pomoč je bila neprecenljiva.

Največja zahvala pa gre moji družini in prijateljem. Boštjan, Gaber, Bor in Iva, zaradi vas je vse imelo smisel. Hvala mami, oči in Brina, ki niti enkrat niste podvomili vame. Pina, Tjaša in Gloria, verjele ste vame, tudi ko sama več nisem. Hvala vam za vašo ljubezen, vsi skupaj.

Povzetek

Apoptoza je evolucijsko ohranjena oblika programirane celične smrti, ki evkariontom omogoča odstranitev poškodovanih, potencialno nevarnih in odvečnih celic. Kljub dejstvu, da imajo vodilno vlogo v apoptozi kaspaze, so novejša študija pokazale, da so ob zmernih poškodbah lizosomalnih membran v signalizacijo apoptoze udeleženi tudi katepsini. Natančni mehanizmi sprožitve in poteka celične smrti, ki vključuje poškodbe lizosomalnih membran, pa zaradi obstoječih nesoglasij še vedno niso razjasnjeni.

Pokazano je bilo, da so katepsini udeleženi v apoptozi, sproženi s citokinom TNF, vendar obstajajo različna mnenja o njihovem prispevku v apoptotski kaskadi. Nekateri jim pripisujejo vlogo sprožilcev v samem vrhu signalne poti, večina pa jih umešča v ojačevalno zanko tekom apoptoze ali pa jih sploh ne omenja v apoptotski signalni poti. V prvem delu smo tako preučili vlogo katepsina D (katD) v zunanji poti apoptoze, sprožene s TNF α /cikloheksimidom v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937). Ugotovili smo, da se v celicah najprej aktivira kaspaza 8 in pride do cepitve proapoptotskega proteina Bid. Temu sledi permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane (MOMP) in aktivacija apoptosoma ter kaspaze 3. Nastanek in sproščanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) iz mitohondrijev vodi v permeabilizacijo lizosomalne membrane (LMP), ki je pozen dogodek v apoptozi in vodi v sproščanje katD v citosol. Apoptoze nismo uspeli preprečiti niti z inhibicijo katD niti z inhibicijo cisteinskih katepsinov. Naši rezultati tako potrjujejo trditev, da LMP in sproščeni katepsini niso potrebni za sprožitev apoptoze. Prvič smo pokazali, da pride v celicah U937 do postopne razgradnje endogenega inhibitorja cisteinskih katepsinov, stefina B, ki napreduje z naraščanjem časa inkubacije s TNF α /CHX in jo lahko delno preprečimo s predinkubacijo celic z antioksidantom N-acetil cisteinom (NAC).

V drugem delu pa smo raziskali vlogo katD v notranji poti apoptoze, sproženi z menadionom, ki predstavlja izvor ROS. Pokazano je bilo namreč, da primerna koncentracija menadiona sproži apoptozo, sam mehanizem poteka tako sprožene apoptotske kaskade in predvsem vpletenost katepsinov v njej pa ostajata nerazjasnjena. Prvič smo pokazali, da pride v celicah U937 ob sprožitvi apoptoze z menadionom do cepitve proapoptotskega proteina Bid ter da so za cepitev odgovorni cisteinski katepsini. Ugotovili smo, da se aktivirata obe sprožitveni kaspazi 8 in 9, pride pa tudi do cepitve proteina PARP. Z uporabo inhibitorjev proteaz smo tudi v primeru apoptoze, sprožene z menadionom, ovrgli ključno vlogo katD in cisteinskih katepsinov pri tem procesu. Ugotovili pa smo, da pride do cepitve stefina B tudi v apoptozi, sproženi z menadionom, kar smo preprečili s predinkubacijo celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK ter delno z inhibitorjem katD, PepA-P.

Abstract

Apoptosis is an evolutionary conserved form of programmed cell death by which eukaryotic organisms eliminate potentially dangerous, superfluous and damaged cells. Caspases are a family of cysteine proteases which have a key role in the initiation and execution of apoptosis. In addition, upon lysosomal membrane permeabilization (LMP) proteases are released into the cytosol; however their mechanism of action is not well understood.

Lysosomal cathepsins were previously found to be involved in tumor necrosis factor- α (TNF α)-induced apoptosis. However, there are opposing views regarding their role as either initiators or amplifiers of the signaling cascade as well as the order of molecular events during this process. The aim of our work was to understand the role of cathepsin D (catD) in TNF α /cycloheximide-induced apoptosis in U937 human monocytic cells. TNF α -induced apoptosis proceeds through caspase-8 activation, processing of the pro-apoptotic molecule Bid, mitochondrial membrane permeabilization, and caspase-3 activation. The translocation of lysosomal catD into the cytosol was a late event. In addition, apoptosis was not prevented by preincubation of cells with either catD inhibitor, PepA-P or cysteine cathepsin inhibitor, E64d, suggesting that lysosomal membrane permeabilization and the release of cathepsins are not required for the induction of apoptosis. For the first time, we show that apoptosis is accompanied by degradation of the cysteine cathepsin inhibitor stefin B. CatD did not exhibit a crucial role in this step. However, this degradation was partially prevented through pre-incubation with the antioxidant N-acetyl cysteine, although it did not prevent apoptosis and its progression.

In the second part, we aimed to explain the role of catD in menadione-induced intrinsic apoptotic pathway in U937 human monocytic cells. It was previously shown that menadione is a ROS inducer and was able to induce apoptosis, which was concentration dependent. Again, the impact of cathepsins in this apoptotic pathway is not fully understood. For the first time, we show that menadione-induced apoptosis is accompanied by cleavage of the proapoptotic protein Bid by cysteine cathepsins. In addition, we show that initiator caspases 8 and 9 are activated, a process that culminates with PARP cleavage. Apoptosis was not prevented by preincubation of cells with either PepA-P or E64d, meaning that neither cathepsin D nor cysteine cathepsins are crucial in this pathway. Similarly as in the case of TNF-induced apoptosis, we observed the cleavage of stefin B as a consequence of menadion-triggered apoptosis, which was prevented by preincubation of cells with z-VAD-FMK and partially with PepA-P.

Kazalo

Slike	xv
Tabele	xvii
Kratice	xix
1 Uvod	1
1.1 Apoptoza	1
1.2 Molekularni mehanizmi apoptoze	2
1.2.1 Kaspaze	2
1.2.1.1 Klasifikacija in struktura kaspaz	2
1.2.1.2 Substratna specifičnost in substrati kaspaz	4
1.2.1.3 Uravnavanje delovanja kaspaz	5
1.2.2 Sprožitev apoptoze	5
1.2.2.1 Zunanja (ekstrinzična) pot	5
1.2.2.1.1 Aktivacija receptorja TNF	6
1.2.2.2 Notranja (intrinzična) pot	8
1.2.2.2.1 Od ROS odvisna sprožitev apoptoze – menadion	9
1.2.3 Proteini Bcl-2	9
1.3 Lizosomi v apoptozi	11
1.3.1 Mehanizmi permeabilizacije lizosomalne membrane	11
1.3.2 Katepsini	13
1.3.2.1 Katepsin D	13
1.3.2.1.1 Sinteza, struktura in fiziološka vloga katD	13
1.3.2.2 Cisteinski katepsini	15
1.3.2.2.1 Sinteza, struktura in fiziološka vloga cisteinskih katepsinov	15
1.3.2.3 Uravnavanje delovanja katepsinov	17
1.3.2.3.1 Endogeni inhibitorji cisteinskih katepsinov	17
1.3.2.4 Katepsini v apoptozi	18
2 Namen dela	21
3 Materiali in metode	23
3.1 Materiali	23
3.1.1. Kemikalije	23
3.1.2. Protitelesa	24
3.1.3. Gojišča 25	
3.1.4. Celice 25	
3.1.5. Pufri 25	
3.1.6. Laboratorijska oprema	27
3.2 Metode	28
3.2.1 Metode dela s celicami	28
3.2.1.1 Gojenje celic	28
3.2.1.2 Tripsinizacija in precepljanje celic	28
3.2.1.3 Zamrzovanje in odmrzovanje celic	28
3.2.2 Sprožitev apoptoze s citokinom TNF α /CHX in menadionom	29
3.2.2.1 Določitev optimalne koncentracije TNF α in menadiona	29
3.2.2.2 Sprožitev apoptoze	29
3.2.2.3 Določanje deleža apoptotskih celic	29

3.2.2.4	Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji	29
3.2.2.5	Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi	30
3.2.2.6	Priprava celotnega celičnega lizata	30
3.2.2.7	Priprava citosolnega ekstrakta	30
3.2.2.8	Določanje celotne koncentracije proteinov v vzorcu	30
3.2.2.9	Merjenje encimske aktivnosti	30
3.2.2.10	Rekombinantne kaspaze	31
3.2.2.10.1	Cepitev stefina B z rekombinantnimi kaspazami	31
3.2.2.11	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS	31
3.2.2.12	Imunoprenos	32
4	Rezultati	33
4.1	Ovrednotenje celičnih modelov za sproženje apoptoze s TNF α in menadionom	33
4.2	Sprožitev apoptoze s citokinom TNF α v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)	33
4.2.1	Citokin TNF α sproži s časom inkubacije pogojeno apoptozo v človeški celični liniji U937	34
4.2.2	Kaspazna aktivnost med apoptozo	34
4.2.3	Poškodbe mitohondrijev in lizosomov med apoptozo	35
4.2.4	Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz na potek apoptoze	36
4.2.4.1	Potrditev nekroptoze ob predinkubaciji z inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk	37
4.2.5	Detekcija katD v citosolu med apoptozo	39
4.2.6	Cepitev proteina Bid med apoptozo	39
4.2.7	Razgradnja stefina B med apoptozo	40
4.2.7.1	Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz ter NAC na razgradnjo stefina B ter vpliv NAC na potek apoptoze	41
4.3	Sprožitev apoptoze z menadionom v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)	42
4.3.1	Menadion sproži koncentracijsko pogojeno apoptozo v človeški celični liniji U937	43
4.3.2	Aktivacija kaspaz in cepitev proteina PARP med apoptozo	43
4.3.2.1	Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz na aktivacijo kaspaze 8	44
4.3.3	Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz ter NAC na celično integriteto med apoptozo	45
4.3.4	Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz ter NAC na integriteto lizosomov ter mitohondrijev med apoptozo	45
4.3.5	Detekcija katD in izbranih cisteinskih katepsinov v citosolu med apoptozo	46
4.3.6	Cepitev proteina Bid med apoptozo in vloga izbranih inhibitorjev	47
4.3.7	Cepitev stefina B med apoptozo in vloga izbranih inhibitorjev	48
4.3.7.1	In vitro cepitve stefina B z rekombinantnimi kaspazami	48
5	Razprava	49
5.1	Sprožitev apoptoze s citokinom TNF α v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)	49
5.2	Sprožitev apoptoze z menadionom v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)	52
6	Zaključki	55
	Literatura	57
	Bibliografija	71
	Biografija	73

Slike

Slika 1: Razdelitev kaspaz pri človeku glede na proces, v katerem sodelujejo.....	3
Slika 2: Struktura kaspaz.....	3
Slika 3: Aktivacija kaspaz, ki sodelujejo v apoptozi, in njihovi substrati.....	4
Slika 4: Splošen mehanizem signaliziranja apoptoze in preživetja, ki ga sprožijo ligandi smrti.....	6
Slika 5: Signalizacijske poti, sprožene preko aktivacije receptorja TNF.....	7
Slika 6: Notranja pot apoptoze.....	8
Slika 7: Oksidativni stres (menadion) v pankreatičnih celicah vodi do sprožitve apoptoze preko mitohondrijev in lizosomov.....	9
Slika 8: (A) Razdelitev proteinov družine Bcl-2 in (B) shema povezav med antiapoptotskimi in proapoptotskimi Bcl-2 in njihova vloga v apoptozi.....	10
Slika 9: Mehanizmi permeabilizacije lizosomalne membrane.....	12
Slika 10: Zvitje zrele strukture katepsina D.....	14
Slika 11: Mehanizem delovanja aspartatnih proteaz.....	14
Slika 12: Mehanizem delovanja cisteinskih proteaz.....	16
Slika 13: Shematski prikaz substratnih vezavnih mest v aktivnem mestu cisteinskih proteaz.....	16
Slika 14: Odstotek živih (LL; Ann-/PI-), zgodnje apoptotskih (LR; Ann+/PI-) ter pozno apoptotskih celic (UR; Ann+/PI+) U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX.....	34
Slika 15: (A) Hidroliza substrata Ac-IETD-AMC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX. (B) Hidroliza substrata Ac-DEVD-AFC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX.....	35
Slika 16: Integriteta mitohondrijev in lizosomov celic U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX.....	36
Slika 17: Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d in z-VAD-fmk na celično integriteto U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX.....	37
Slika 18: Sproženje nekroptoze ob tretiranju U937 z z-VAD-fmk ter TNF α /CHX.....	38
Slika 19: Hidroliza substrata Bz-RGFFP-4-MeO β NA v celotnih celičnih lizatih U937.....	39
Slika 20: Imunodetekcija katepsina D med apoptozo, sproženo s TNF α /CHX, v celicah U937.....	39
Slika 21: Imunodetekcija celotne (Bid) in cepljene oblike (tBid) proteina Bid v celicah U937 po različnih časih inkubacije s TNF α /CHX.....	40
Slika 22: Imunodetekcija stefina B v celicah U937 po različnih časih inkubacije s TNF α /CHX.....	41
Slika 23: (A) Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d, z-VAD-fmk in antioksidanta NAC na razgradnjo stefina B po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX. (B) Vpliv NAC na celično integriteto U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX.....	42
Slika 24: Odstotek živih (LL; Ann-/PI-), zgodnje apoptotskih (LR; Ann+/PI-) ter pozno apoptotskih celic (UR; Ann+/PI+) U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom.....	43
Slika 25: (A) Imunodetekcija cepljenih oblik kaspaze 8 (p18), kaspaze 9 (35 in 37 kDa) ter proteina PARP (25 kDa) v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom. (B) Hidroliza substrata Ac-DEVD-AFC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom.....	44
Slika 26: Imunodetekcija cepljene oblike kaspaze 8 (p18) ter vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-fmk na njeno cepitev v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom ..	44
Slika 27: Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d, z-VAD-fmk ter NAC na celično integriteto U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom.....	45
Slika 28: Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d, z-VAD-fmk ter NAC na integriteto lizosomov (AO) ter mitohondrijev (MR) U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom.....	46

Slika 29: Imunodetekcija katepsinov B, D, C ter S med apoptozo, sproženo z menadionom v celicah U937	46
Slika 30: Imunodetekcija cepljene oblike (tBid) proteina Bid ter vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-fmk na njegovo cepitev v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom	47
Slika 31: Imunodetekcija stefina B ter vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-fmk na njegovo cepitev v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom	48
Slika 32: Mehanističen vpogled na apoptozo, sproženo s $\text{TNF}\alpha$ /CHX v celicah U937	51
Slika 33: Mehanističen vpogled na apoptozo, sproženo z menadionom v celicah U937	54

Tabele

Tabela 1: Poimenovanje in katalitske lastnosti človeških cisteinskih katepsinov.	15
Tabela 2: Substrati in njihove značilnosti za določanje encimske aktivnosti.....	31
Tabela 3: Odziv različnih celičnih linij na TNF α (10–20 ng/ml)/CHX(1 μ /ml) ali menadion (20–50 μ M) v trajanju 12 h.	33

Kratice

a.e.	... arbitrarne enote
angl.	... angleško
Ac-DEVD-AFC	... N-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-7-amino-4-trifluorometilkumarin
Ac-IETD-AMC	... N-acetil-izolevcin-glutamat-treonin-aspartat-7-amino-4-metilkumarin
AIF	... dejavnik, ki sproži apoptozo
aneksin V-PE	... aneksin V-fikoeritrin
AO	... akridin oranž
Apaf-1	... aktivacijski dejavnik 1 apoptozne proteaze
APS	... amonijev persulfat
ASMase	... kislina sfingomielinaza
ATP	... adenozin trifosfat
Bak	... antagonist Bcl-2 in ubijalec
Bax	... z Bcl-2 povezan protein x
Bcl-2	... protein 2 iz limfoma celic B
Bcl-w	... protein 2, podoben Bcl-2
Bcl-xL	... protein 1, podoben Bcl-2
Bik	... ubijalec, ki sodeluje z Bcl-2
BH	... regije, homologne z Bcl-2
Bid	... protein smrti, ki reagira z domeno BH-3
Bim	... posrednik celične smrti, ki reagira z Bcl-2
BIR	... bakulovirusno zaporedje IAP
BSA	... goveji serumski albumin
CAD	... DNaza, ki jo aktivira kaspaza
CARD	... domena, ki veže kaspaze
CED	... protein smrti pri <i>Caenorhabditis elegans</i>
cFLIP	... celični FLIP
cIAP	... celični inhibitor apoptoze
CHAPS	... 3-[(kloraminopropil)dimetilamonij]-2-hidroksi-1-propan
CHX	... cikloheksimid
CrmA	... modifikator A odgovora na citokine
DD	... domena smrti
DED	... efektorska domena smrti
DFO	... deferoksamin; kelator železovih ionov
DIABLO	... protein z nizkim pI, ki neposredno veže IAP
DISC	... signalni kompleks, ki sproži smrt
DMEM	... po Dulbeccu spremenjeno gojišče Eagle
DMSO	... dimetil sulfoksid
DNK	... deoksiribonukleinska kislina
DR	... receptor smrti
DTT	... ditiotreitol
E-64d	... (2S,3S)-trans-epoksisukcinil-L-levcilamido-3-metilbutan etilni ester
ECL	... povečana kemoluminiscenca
ECM	... zunajcelični matriks
EDTA	... etilendiamin tetra acetat
EGTA	... etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetra acetat
EGF	... epidermalni rastni dejavnik
FADD	... na Fas vezan protein z domeno smrti

Fas	... receptor smrti Fas, tudi CD95 in APO-1
FasL	... Fas ligand
FBS	... serum govejih zarodkov
FBS-HI	... toplotno inaktiviran serum govejih zarodkov
FLICE	... ICE, podoben FADD-u
FLIP	... proteini, ki inhibirajo FLICE
HEPES	... 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonična kislina
Hrk	... aktivator harakiri apoptoze
HtrA2/Omi	... protein A2, ki se potrebuje pri visoki temperaturi
IAP	... inhibitor apoptoze
ICAD/DFF45	... inhibitor CAD/DNA fragmentacijski dejavnik 45
ICE	... encim, ki cepi interleukin 1 β
JNK	... C-Jun N-terminalna kinaza
kDa	... kilo dalton
katD	... katepsin D
λ_{em}	... emisijska valovna dolžina svetlobe
λ_{ex}	... vzbujevalna valovna dolžina svetlobe
Lamp	... membranski protein, povezan z lizosomom
LeuLeuOMe	... L-Levcil-L-levcin metilni ester
LMP	... permeabilizacija lizosomalne membrane
M6PR	... receptor manoze 6-fosfat
MAPK	... kinaza, ki jo aktivira mitogen
Mcl	... protein za celično diferenciacijo mieloidne levkemije
MHC	... poglobitni histokompatibilnostni kompleks
MOMP	... permeabilizacija zunanje membrane mitohondrija
mRNA	... informacijska ribonukleinska kislina
NAC	... N-acetil cistein
NaDS	... natrijev dodecil sulfat
NF- $\kappa\beta$	... jedrni dejavnik $\kappa\beta$
NP40	... nonilfenilpolietilen glikol
Noxa	... lat. poškodba; s PMA inducirani protein
p53	... protein 53
PAGE	... poliakrilamidna gelska elektroforeza
PARP	... poliADP-riboza polimeraza
PBS	... fosfatni pufer z NaCl
PCS	... programirana celična smrt
PE	... fikoeritrin
PepA-P	... Pepstatin A, Penetratin
pH	... negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PI	... propidijev jodid
PIDD	... protein z domeno smrti, ki ga inducira p53
PLA2	... fosfolipaza A2
PLAD	... domena, ki se sestavi pred vezavo liganda
Puma	... modulator apoptoze, ki ga poviša p53
rcf	... relativna centrifugalna sila
REF	... relativne enote fluorescence
RIP	... protein, ki sodeluje z receptorjem
ROS	... reaktivne kisikove zvrsti
RPMI	... Roswell Park Memorial Institute
SMAC	... drugi mitohondrijski aktivator kaspaz
sod.	... sodelavci
tBid	... cepljena oblika molekule Bid
TBST	... pufer s Trisom, NaCl in detergentom Tween-20
TEMED	... N, N, N', N'-tetrametilendiamin
TNF	... dejavnik tumorske nekroze
TNF α	... dejavnik tumorske nekroze alfa; član 2 naddružine ligandov TNF
TNF-R1	... receptor tipa 1 za TNF
TRADD	... na receptor TNF vezan protein, ki vsebuje domeno DD
TRAF-2	... dejavnik 2, povezan s TNF-receptorjem
TRAIL	... TNF-ju soroden ligand, ki sproža apoptozo
TRAIL-R	... TRAIL receptor

TRIS	... tris (hidroksimetil) aminometan
TWEAK	... TNF-ju podoben šibek sprožitelj apoptoze
VDAC	... napetostno odvisni anionski kanalček
XIAP	... na kromosom X vezan inhibitor apoptoze
Z-VAD-FMK	... N-benziloksikarbonil-valil-alanil-aspartil-fluorometilketon

Poglavje 1

Uvod

1.1 Apoptoza

Programirana celična smrt (PCS) označuje celične signalne poti, ki so ključne za razvoj, tkivno homeostazo in patogenezo živali. Originalno je bil termin PCS sinonim za apoptozo, nedavno pa so bili odkriti alternativni mehanizmi PCS. Poleg apoptoze so tako pomembne še avtofagija in nekroptaza ter alternativne oblike celične smrti (Fuchs & Steller, 2015; Galluzzi in sod., 2014; Kroemer in sod., 2009).

Apoptoza je evolucijsko ohranjena oblika programirane celične smrti, ki evkariontom omogoča odstranitev poškodovanih, potencialno nevarnih in odvečnih celic. Tako ima pomembno vlogo pri vzdrževanju celične in tkivne homeostaze, diferenciaciji, uravnavanju delovanja imunskega sistema in pri razvoju večceličnih organizmov (Hengartner, 2000; Meier in sod., 2000; Yuan in sod., 1993).

Nepravilnosti v uravnavanju signaliziranja tekom apoptoze povzročajo številne bolezni, pri čemer nezadostna apoptoza vodi v razvoj rakavih obolenj, avtoimunih bolezni (npr. nezmožnost eliminacije avtoreaktivnih limfocitov), sepse in virusnih okužb, medtem ko prekomerna apoptoza prispeva k nevrodegenerativnim, kardiovaskularnim ter avtoimunim boleznim, kot je npr. nekontrolirana apoptoza v določenih organih (Reed, 2002).

Apoptozo je prvi opisal John Kerr (Kerr in sod., 1972). Zanj so značilne naslednje morfološke spremembe v celicah: razgradnja citoskeleta, ki vodi v krčenje celice in posledično izgubo stikov s sosednjimi celicami, kondenzacija jedra in citoplazme, čemur sledi brstenje celične membrane ter v končnem koraku fragmentacija celic v apoptotska telesca, ki vsebujejo citosol, kromatin in organele. Sledi fagocitoza telesc s strani makrofagov brez sproženja vnetnega odziva (Kroemer in sod., 2009). Najznačilnejša biokemijska sprememba v apoptotskih celicah pa je aktivacija kaspaz, proteolitskih encimov iz družine cisteinskih proteaz (Kroemer in sod., 2009; Salvesen & Dixit, 1997).

1.2 Molekularni mehanizmi apoptoze

Apoptotsko signalno omrežje je gensko kontrolirano in pripravljeno na aktivacijo s t. i. signali smrti (Ishizaki in sod., 1995; Weil in sod., 1996). Signali so lahko zunajcelični, kot npr. vezava ligandov smrti na celične receptorje, ali znotrajcelični, kot so poškodbe DNK, sevanje, citotoksiki, pomanjkanje preživetvenih signalov in motnje celičnega cikla (Pereira & Amarante-Mendes, 2011).

Velik del razumevanja celične smrti izvira iz genetskih študij na nematodu *Caenorhabditis elegans* (Ellis & Horvitz, 1986), pri katerem so identificirali več genov, ki sodelujejo pri apoptozi, med drugim tudi gene za kaspaze. Nadaljnje študije na sesalcih ter muhi *Drosophila melanogaster* so določile ujemajoče se gene z nematodnimi ter tako pokazale, da so komponente celične smrti evolucijsko ohranjene (Richardson & Kumar, 2002).

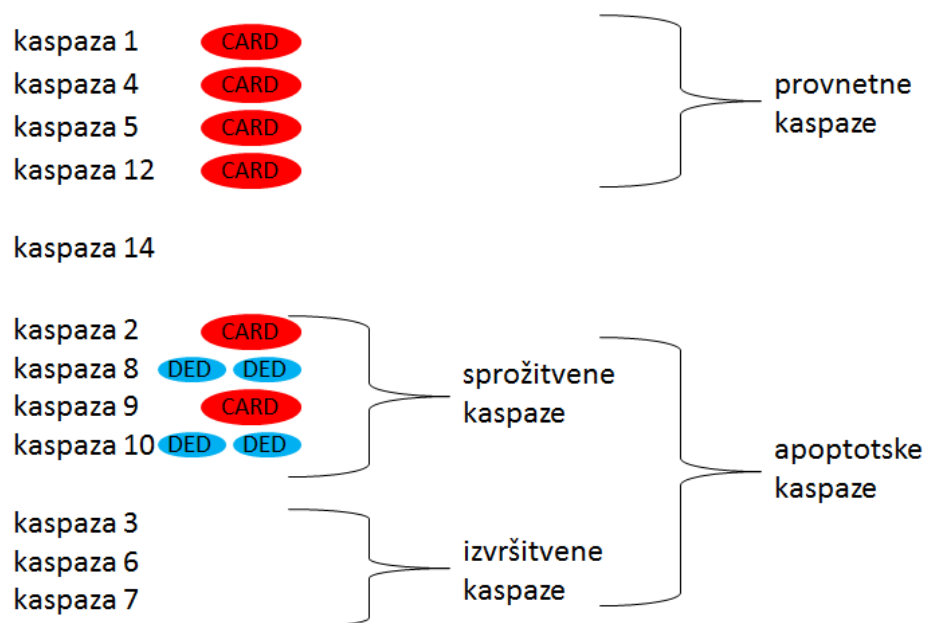
1.2.1 Kaspaze

1.2.1.1 Klasifikacija in struktura kaspaz

Kaspaze spadajo v družino aspartat-specifičnih proteaz (C14, klan CD) in so odgovorne za koordinacijo ter izvajanje apoptoze (Mcllwain in sod., 2013). Njihovo ime odraža vlogo, ki jo opravljajo v celicah, so namreč od cisteina odvisne aspartat-specifične endoproteaze (angl. cysteine-dependent aspartate-specific proteases) (Mcllwain in sod., 2013). Opravljajo zelo specifične cepitve, in sicer za aspartatom ter substrat navadno cepijo samo nekajkrat ali celo le enkrat. Tako proteinov po večini ne razgrajujejo, temveč jih aktivirajo, inaktivirajo ali pa spremenijo njihovo funkcijo oz. lokacijo v celici (Bratton & Salvesen, 2010; Crawford & Wells, 2011; Gutierrez & Ronai, 2006).

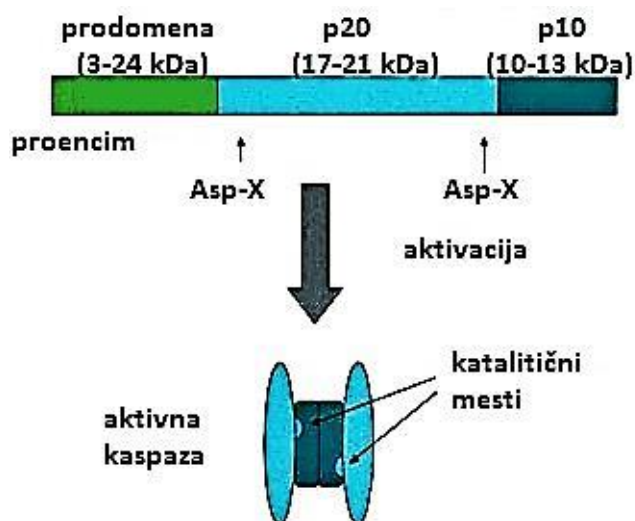
Proteaza Ced-3 (angl. cell death defective) je edina potrebna za sprožitev apoptoze pri nematodu *Caenorhabditis elegans*, v bolj kompleksnih organizmih pa sodeluje več kaspaz. Prvi odkrit homolog kaspaze Ced-3 pri sesalcih je bila ICE oz. kaspaza-1 (angl. interleukin-1-converting enzyme), ki je provnetna kaspaza. Sledila so mu odkritja drugih homologov in tako danes pri sesalcih poznamo 14 kaspaz (Man & Kanneganti, 2015).

Glede na njihovo vlogo v celici lahko kaspaze razdelimo na provnetne in apoptotske (slika 1). Apoptotske kaspaze nadalje razdelimo na sprožitvene ter izvršitvene (Crawford & Wells, 2011), pri čemer ima kaspaza 2 značilnosti obeh skupin (Ribe in sod., 2008). Sprožitvene kaspaze se aktivirajo prve in sprožijo apoptotsko kaskado. Cepijo in s tem aktivirajo še izvršitvene kaspaze, le-te pa cepijo številne citoplazemske in jedrne tarčne proteine, kar vodi v značilno apoptotsko morfologijo celic.



Slika 1: Razdelitev kaspaz pri človeku glede na proces, v katerem sodelujejo. Povzeto po (Crawford & Wells, 2011).

Kaspaze se sintetizirajo in so prisotne v citosolu vseh celic v obliki neaktivnih prekurzorjev (zimogenov/proencimov), sestavljenih iz treh domen: N-terminalni propeptid, velika podenota ter mala podenota (Man & Kanneganti, 2015), pri čemer so sprožitvene prokaspaze monomeri, izvršitvene pa dimeri. Propeptidi izvršitvenih kaspaz so kratki (20 aminokislin pri kaspazi 3), medtem ko dolgi propeptidi sprožitvenih kaspaz (do 200 aminokislin pri kaspazah 8 in 10) vsebujejo efektorsko domeno smrti (DED) ali pa domeno, ki veže kaspaze (CARD). Obe domeni sodelujeta pri aktivaciji kaspaz (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004; Pop & Salvesen, 2009) (slika 2).



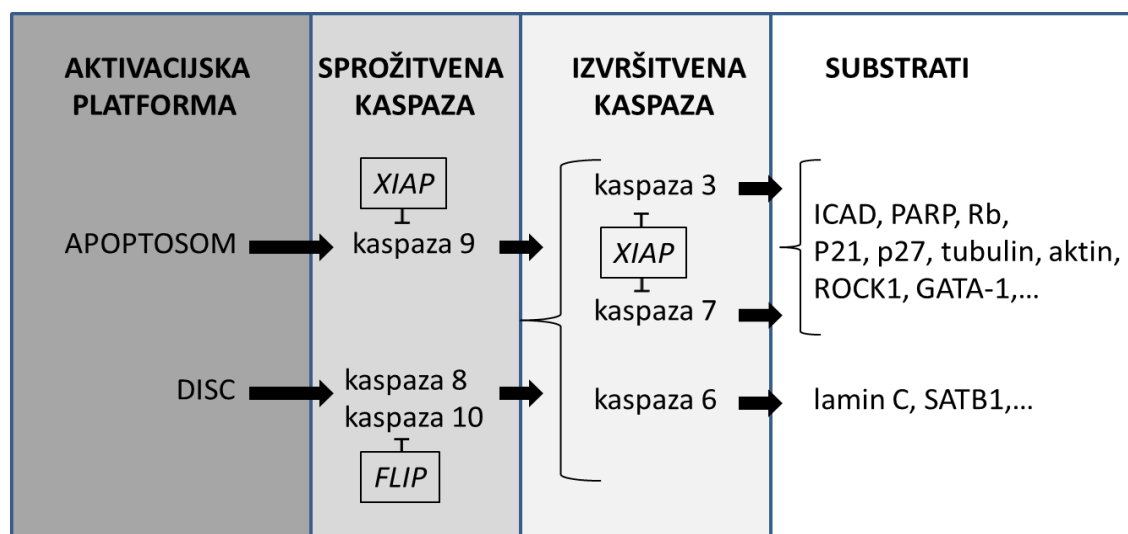
Slika 2: Struktura kaspaz. Proencim je sestavljen iz N-terminalnega propeptida (prodomena; 3-24 kDa), velike podenote (p20; 17-21 kDa) ter male podenote (p10; 10-13 kDa). V aktivni obliki so kaspaze dimeri, vsaka molekula pa ima dve aktivni (katalitični) mesti (Pop & Salvesen, 2009).

Ob aktivaciji se katalitična domena (p20 in p10) pri aminokislini Asp razcepi na veliko in malo podenoto, ki sta med seboj povezani. V aktivni obliki so tako sprožitvene kot izvršitvene kaspaze dimeri, vsaka molekula pa ima dve aktivni mesti (Pop & Salvesen, 2009).

Sicer pa aktivacija sprožitvenih in izvršitvenih kaspaz poteka na različen način. Sprožitvene kaspaze za aktivacijo potrebujejo homodimerizacijo monomerov, pri čemer dimerizacija poteče kot posledica bližine molekul (Riedl & Salvesen, 2007). Prokaspaze se namreč z adapterskimi proteini preko protein-protein interakcij z DED domenami, ki vežejo CARD domene v kaspazah, povežejo v komplekse, kjer se doseže visoka lokalna koncentracija kaspaz (Pop & Salvesen, 2009). Ker so izvršitvene prokaspaze dimeri, za aktivacijo potrebujejo razcep povezovalnega peptida med veliko in malo podenoto katalitične domene (Alenzi in sod., 2010; Boatright & Salvesen, 2003). Cepitev izvršijo bodisi sprožitvene kaspaze bodisi grancim B (Pop & Salvesen, 2009).

1.2.1.2 Substratna specifičnost in substrati kaspaz

V splošnem velja, da kaspaze cepijo substrate za aspartatnim aminokislinskim preostankom. Nedavno pa je bilo pokazano, da lahko kaspaze v apoptozi cepijo tudi za glutamatom in fosfoserinom (Seaman in sod., 2016). Dober substrat za kaspaze pa mora hkrati zadovoljiti več kriterijev: 1) zaporedje P4-P3-P2-P1-P1', pri čemer kaspaza cepi med P1 in P1', predstavlja substrat za kaspaze, ko je na mestu P1 aspartat. Izjema je kaspaza Dronc (*Drosophila*), ki in vitro cepi tudi za glutaminom (Snipas in sod., 2008). 2) P1' aminokislinski preostanek mora biti majhen in nenabit (Gly, Ser in Ala). 3) Nadalje morajo biti P4-P3-P2 preostanki komplementarni interakcijam v katalitičnem žlebu. 4) Cepitveno mesto na substratu P4-P1' mora biti izpostavljeno vodnemu okolju ter 5) kaspaze in njihovi substrati morajo imeti enako lokacijo (Pop & Salvesen, 2009).



Slika 3: Aktivacija kaspaz, ki sodelujejo v apoptozi, in njihovi substrati. Oligomerna proteinska platforma aktivira sprožitveno kaspazo, ki nato cepi specifične kaspaze. Ta dvostopenjski proces aktivacije ojača apoptotski signal in ustvarja dodatna regulacijska mesta. Inhibitorji kaspaz (prikazani v okvirjih) regulirajo poti aktivacije. Povzeto po (Pop & Salvesen, 2009).

Znanih je že preko 400 celičnih proteinov, ki jih tekom apoptoze cepijo kaspaze (Pop in Salvesen, 2009) (slika 3). Mednje sodijo proteini, ki sodelujejo v celičnem signaliziranju, kot npr. regulatorja apoptoze, proteina Bcl-2 in Bcl-xL, ter inhibitor kaspaze-8 cFLIP; proteini, vključeni v celično strukturo, kot so vimentin, plektin, tubulin in aktin; proteini, ki nadzorujejo celični cikel ter popravila DNK (Alenzi in sod., 2010; Pop & Salvesen, 2009). Kaspaza 3 tako npr. cepi in aktivira beljakovino ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase), ki sicer zavira endonukleazo CAD. Aktivna CAD nato cepi jedrno DNK (Enari in sod., 1998; Liu in sod., 1997). Kaspazi 3 in 7 nadalje cepita jedrni encim poliADP-ribozo polimerazo (PARP), ki sodeluje pri popravilih DNK. Cepitev kinaze ROCK1 pa je med drugim ključna za brstenje celične membrane (Enari in sod., 1998).

1.2.1.3 Uravnavanje delovanja kaspaz

Proces proteolize poteče ireverzibilno, zato mora biti natančno reguliran. Poglavitni načini preprečevanja nezaželene proteolize v celici so inhibicija kaspaz, njihova razgradnja ter prisotnost inhibitorjev, ki privabljajo kaspaze (*angl.* decoy inhibitors) (Pop & Salvesen, 2009).

Inhibicija kaspaz izkorišča strukturno podobnost inhibitorja z dobrim substratom. Takšna primera sta virusna kaspazna inhibitorja CrmA in p35/p49, ki sta nespecifična inhibitorja aktivnega mesta kaspaz (Stennicke in sod., 2002). Za razliko od virusnih inhibitorjev človeški kaspazni inhibitor selektivno inhibira kaspazo 9 (preko domene BIR3) in kaspazi 3 in 7 (preko domene BIR2) (Eckelman in sod., 2006).

Razgradnja kaspaz poteka preko proteasoma s pomočjo proteinov IAP. Poleg BIR domen ima mnogo proteinov IAP tudi domeno RING ter ubikvitin-vezavno domeno (Blankenship in sod., 2009; Gyrd-Hansen in sod., 2008).

Pri inhibitorjih, ki privabljajo kaspaze, gre za preprečevanje aktivacije kaspaz, gre namreč za proteine, ki so strukturno podobni kaspaznim prodomenam, ki znotraj aktivacijskih platform tekmujejo za adaptorske proteine. Primer inhibitorja vabe je FLIP, ki je kaspazi-8 podoben protein, ki vsebuje dve domeni DED in v platformi DISC preprečuje vezavo prokaspaz 8 in 10 in s tem njuno aktivacijo (Earnshaw in sod., 1999).

1.2.2 Sprožitev apoptoze

Sprožitev apoptotske kaskade izvira bodisi iz zunanosti celice (ekstrinzični signali) zaradi pomanjkanja rastnih faktorjev, delovanja steroidnih hormonov ali vezave ligandov smrti na zunajcelične receptorje bodisi iz notranosti celice (intrinzični signali) npr. zaradi poškodb DNK. Apoptotski signali vodijo v aktivacijo kaspaz, ki izvršijo apoptozo (Boatright & Salvesen, 2003; Fuchs & Steller, 2015; Pereira & Amarante-Mendes, 2011).

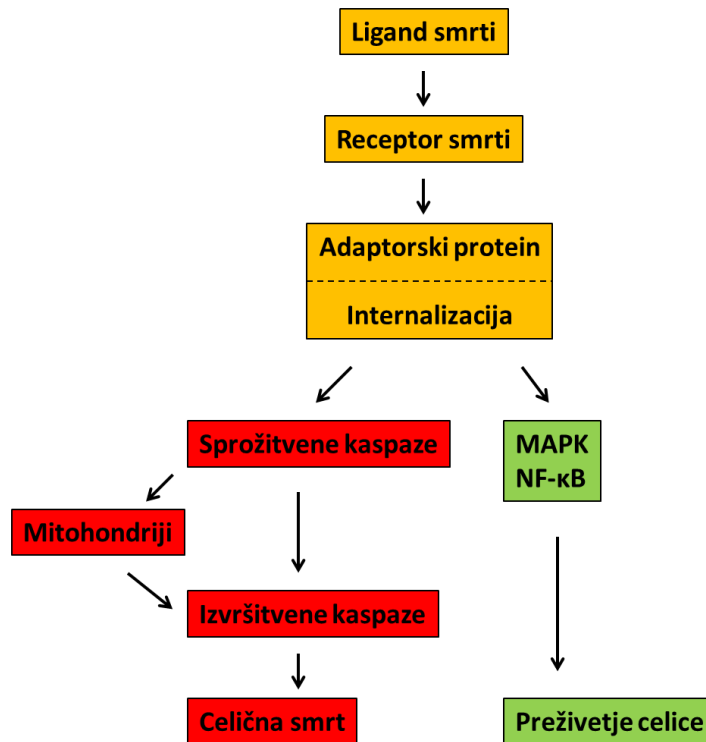
1.2.2.1 Zunanja (ekstrinzična) pot

Zunanjo pot apoptoze sproži vezava ligandov smrti na zunajcelične receptorje smrti. Receptorji smrti spadajo v družino receptorjev dejavnika tumorske nekroze (TNF), med katerimi so najbolj znani TNFR1 (CD120a), Fas (CD95/APO-1), receptor TRAIL 1 (TRAIL-R1/DR4) in receptor TRAIL 2 (TRAIL-R2/DR5/APO-2) (Ashkenazi & Dixit, 1998; Guicciardi & Gores, 2009; Locksley in sod., 2001). Vsi receptorji smrti imajo ohranjeno zaporedje v citoplazemski regiji DD (*angl.* death domain), imenovani domena smrti, ki ima ključno vlogo pri sprožitvi apoptoze (Ashkenazi & Dixit, 1998; Locksley in sod., 2001).

Aktivacija receptorjev smrti poteče z vezavo ustreznih citokinov iz družine TNF. Na receptor TNF se tako veže TNF, na receptor Fas se veže ligand FasL in na receptorje TRAIL se veže TRAIL (Ashkenazi & Dixit, 1998; French & Tschopp, 2003). Vezava liganda sproži oligomerizacijo membranskega receptorja in posledično vezavo adaptorskih proteinov (TNF receptor-associated protein with death domain TRADD in Fas-associated protein with death domain FADD) na domeno smrti receptorja. Adaptorski proteini imajo efektorsko domeno smrti (*angl.* death effector domain DED), preko katere se povežejo s sprožitvenima

prokaspazama 8 ali 10, ki v nastalem kompleksu, imenovanem DISC (angl. death inducing signaling complex), dimerizirata in se s tem aktivirata ter sprožita apoptotsko kaskado (Guicciardi & Gores, 2009).

Vezava receptorjev smrti lahko namesto apoptoze sproži celično proliferacijo, diferenciacijo ali pa nastanek kemokinov ter vnetni odziv, kar pa ni rezultat inhibicije apoptoze, temveč gre za kompleksen proces regulacije preko adaptorskih proteinov in internalizacije signalnih kompleksov (Guicciardi & Gores, 2009). Splošen mehanizem poteka signaliziranja preko receptorjev smrti je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Splošen mehanizem signaliziranja apoptoze in preživetja, ki ga sprožijo ligandi smrti. Povzeto po (Guicciardi & Gores, 2009).

1.2.2.1.1 Aktivacija receptorja TNF

TNF α je vnetni citokin, ki sodeluje v mnogih fizioloških ter patoloških procesih, kot so apoptoza, nekroza, embrionalni razvoj, uravnavanje cirkadianih ritmov, obramba pred virusnimi ter bakterijskimi obolenji, mediacija sistemskih vnetnih odzivov ter predstavlja pomemben dejavnik tveganja za nastanek in napredovanje tumorjev, njihove invazivnosti ter nastanek metastaz (Brenner in sod., 2015; MacEwan, 2002; Sedger & McDermott, 2014; Wajant in sod., 2003).

Aktivacija receptorja TNF poteče z vezavo TNF α na zunajcelična receptorja TNFR1 ali TNFR2. TNF-R1 se nahaja v vseh tkivih in je glavni posredovalec signaliziranja receptorja TNF, TNF-R2, ki je brez domene smrti, pa najdemo predvsem pri limfocitih ter endoepitelijskih celicah (Chu, 2013; Jin & El-Deiry, 2005).

TNF α z vezavo na zunajcelični del receptorja TNFR1 povzroči, da TNFR1 homodimerizira, njegova domena smrti pa se konformacijsko spremeni tako, da se nanj veže adaptorski protein TRADD preko svoje domene smrti.

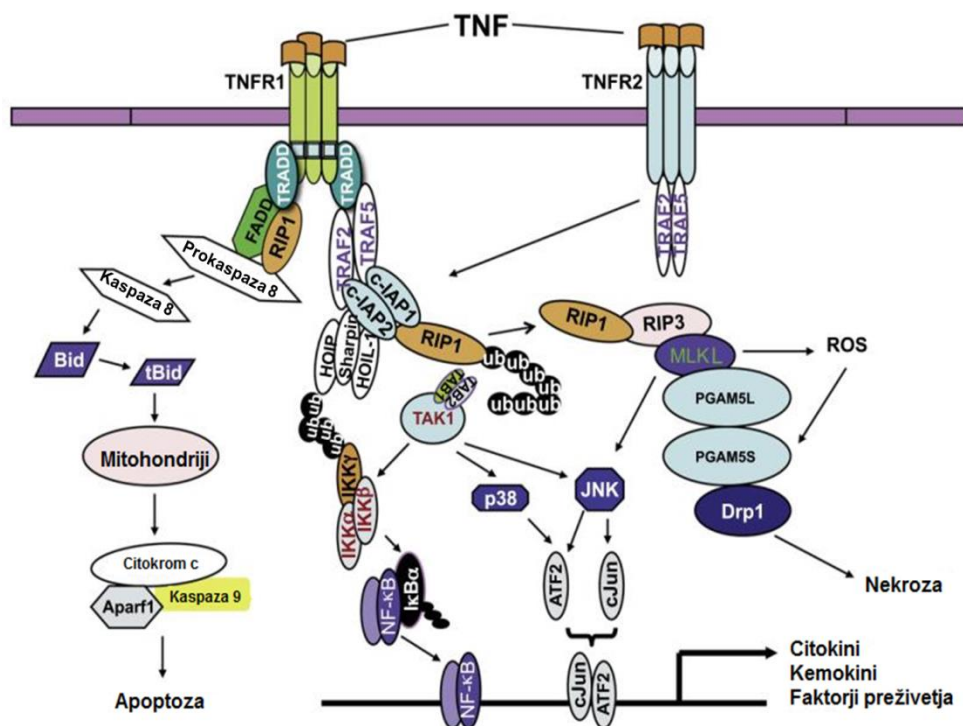
Na TRADD se nato vežejo tako TNFR vezavni faktorji (TNFR associated factor TRAF), kot sta TRAF2 in TRAF5, kot tudi celični proteini IAP 1 in 2 (c-IAP1/2) in tako skupaj tvorijo TNF receptorski signalni kompleks (TNF-RSC). Nanj se nato veže ubikvitin vezavni kompleks LUBAC (HOIL-1, HOIP, Sharpin), ki z ubikvitinacijo omogoči vezavo RIP1 in IKK na TNF-RSC. Poliubikvitiniran RIP1 sproži aktivacijo TAK1, ki nato aktivira kompleks IKK, kinazo JNK ter p38 (Chu, 2013). IKK aktivira in fosforilira inhibitor I- κ B ter ga tako označi

za razgradnjo s proteasomom, kar omogoči, da se transkripcijski faktor NF- κ B translocira v jedro, kjer vpliva na izražanje številnih genov, pomembnih za celično preživetje (provnetnih citokinov, kemokinov, rastnih faktorjev, XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ...) (Chu, 2013; Wajant in sod., 2003). 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 in diferenciaciji (Shaulian & Karin, 2002).

Na TRADD pa se lahko namesto TNFR vezavnih faktorjev vežeta FADD in deubikvitiniran RIP1 ter se s svojima domenama smrti DD povežeta z DED domenama prokaspaze 8, ki se v avtokatalitičnem procesu aktivira in sproži apoptozo (Kuang in sod., 2000). To poteče le v primeru, ko je aktivacija NF- κ B zavrneta, in sicer ob inhibiciji proteinske sinteze ali ob izbitju gena za inhibitor NF- κ B, I- κ B (Jin & El-Deiry, 2005; Wajant in sod., 2003).

Na podlagi indukcije apoptoze preko receptorjev Fas in TRAIL sta bila definirana dva tipa celic glede na potek apoptoze po aktivaciji kaspaze 8. Celice tipa I so neodvisne od mitohondrijev, kar pomeni, da kaspaza 8 direktno cepi in s tem aktivira kaspazo 3 (Chu, 2013; Ferreira in sod., 2012; Scaffidi in sod., 1998). V celicah tipa II pa je potrebna ojačitev signala in sicer kaspaza 8 najprej cepi molekulo Bid, katere skrajšana oblika tBid (angl. truncated Bid) omogoči aktivacijo in oligomerizacijo proteinov Bax in Bak v zunanji mitohondrijski membrani, kar poruši mitohondrijski membranski potencial in vodi v sproščanje molekul iz mitohondrija v citosol. Tako sprožena mitohondrijska pot apoptoze aktivira zadostno količino kaspaze 3 in sproži apoptozo (Li in sod., 1998; Luo in sod., 1998; Yin in sod., 1999). Ugotovljeno je bilo tudi, da ekspresija XIAP vpliva na to, ali se celice obnašajo kot celice tipa I ali celice tipa II. Slednje vsebujejo velike količine XIAP, zato aktivacija receptorjev smrti vodi v apoptozo le v primeru, ko se zaradi MOMP iz intermembranskega mitohondrijskega prostora (IMP) sprostita Smac/DIABLO in HTRA2/Omi (Jost in sod., 2009; Kaufmann in sod., 2012).

Deubikvitiniran RIP1 pa se lahko poveže tudi z RIP3 in tako nastane RIP1-RIP3 vezavni kompleks, ki se imenuje nekrosom. Znotraj kompleksa poteče vzajemna fosforilacija RIP1 in RIP3. Fosforiliran RIP3 preko MLKL aktivira PGAM5, ki z defosforilacijo aktivira protein Drp1, kar vodi v nekrozo (Chu, 2013). Ta oblika programirane nekroze se imenuje nekroptaza in poteče v primeru, ko je kaspaza 8 inhibirana (Vanden Berghe in sod., 2014). Na sliki 5 so shematsko prikazane signalizacijske poti, sprožene preko aktivacije receptorja TNF.



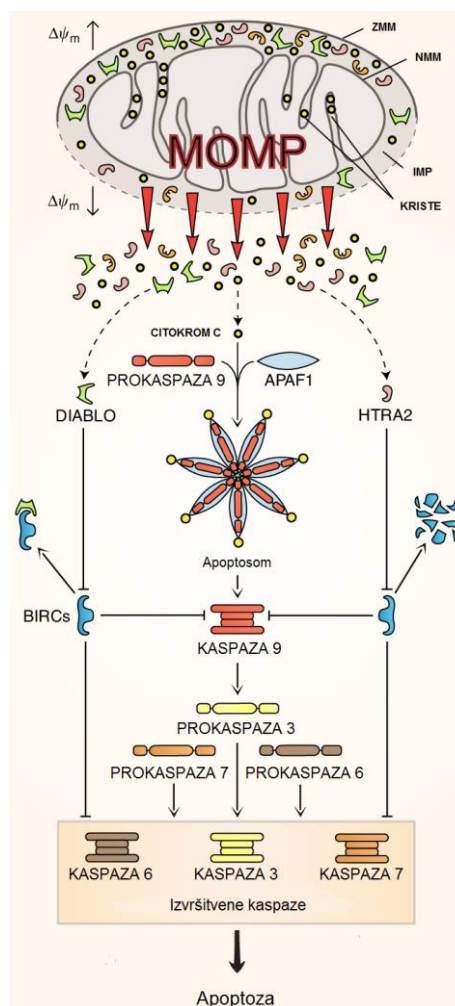
Slika 5: Signalizacijske poti, sprožene preko aktivacije receptorja TNF. Povzeto po (Chu, 2013).

1.2.2.2 Notranja (intrinzična) pot

Notranjo pot apoptoze sprožijo različne poškodbe v celici, ki so posledica sevanja, delovanja citotoksičnih snovi, oksidativnega stresa, odsotnosti dejavnikov preživetja, pomanjkanja rastnih faktorjev in drugih škodljivih vplivov (Green & Kroemer, 2004; Green & Reed, 1998). V celici pride do permeabilizacije zunanje mitohondrijske membrane (angl. mitochondrial outer membrane permeabilisation, MOMP). Iz medmembranskega mitohondrijskega prostora se zato v citosol sprostijo proapoptotske molekule, kot so citokrom c, HTRA2/Omi in Smac/DIABLO (Tait & Green, 2010).

Citokrom c se v citosolu poveže z adaptorskim proteinom Apaf-1 (angl. apoptotic protease activating factor 1) v encimski kompleks apoptosom. Konformacijska sprememba proteina Apaf-1 ob vezavi citokroma c omogoči izpostavitv N-terminalne domene CARD, ki se poveže s homologno domeno CARD prokaspaze-9, ki se tako veže v apoptosom (Acehan in sod., 2002; Kaufmann & Hengartner, 2001) in v njem dimerizira ter se aktivira v kaspazo 9, ki nadalje aktivira izvršitveni kaspazi 3 in 7 (Riedl & Salvesen, 2007).

Smac/DIABLO in HTRA2/Omi z vezavo ali razgradnjo preprečita delovanje inhibitorjev apoptotskih proteinov in s tem prispevata k sprožitvi kaspazne kaskade (Brenner & Mak, 2009). DIABLO tako z vezavo na protein XIAP (angl. X-linked inhibitor of apoptosis protein) prepreči inhibicijo kaspaz 9, 3, in 7 (Eckelman in sod., 2006; Petersen in sod., 2007). Na sliki 6 je prikazan shematski potek notranje poti apoptoze.

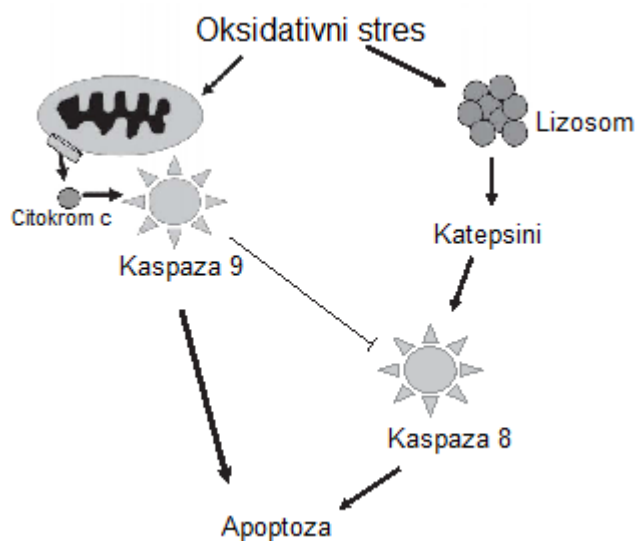


Slika 6: Notranja pot apoptoze. Osrednji dogodek pri tej poti je permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane. ZMM, zunanja mitohondrijska membrana; NMM, notranja mitohondrijska membrana; IMP, intermembranski prostor. Povzeto po (Vitale in sod., 2016).

1.2.2.2.1 Od ROS odvisna sprožitve apoptoze – menadion

Reaktivne kisikove zvrsti (*angl.* reactive oxygen species; ROS), kot so vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$) in kisikov radikal ($\text{O}\cdot$), pri sesalskih celicah v večini nastajajo v mitohondrijih (Balaban in sod., 2005; Turrens, 2003). ROS, ki sicer veljajo za toksične stranske produkte celičnega metabolizma, lahko delujejo kot signalne molekule in uravnavajo številne fiziološke procese (Sena & Chandel, 2012). ROS so pomembni sprožilci apoptoze tako v fiziološkem kot v patološkem kontekstu. Pokazano je bilo, da oksidativni stres lahko sproži tako zunanjo pot apoptoze preko celičnih receptorjev kot tudi notranjo, mitohondrijsko pot apoptoze (Sinha in sod., 2013). Akumulacija ROS v celici in posledična sprožitve apoptoze pomembno prispevata k razvoju številnih bolezni in staranju (Orr & Sohal, 1994).

Dober primer izvora ROS predstavlja menadion (2-methyl-1,4-naphtoquinone, vitamin K3), ki se presnavlja v prisotnosti kovinskih ionov, kar vodi v nastanek ROS, in sicer vodikovega peroksida (H_2O_2), superoksidnega aniona ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in hidroksilnega radikala ($\text{OH}\cdot$) (Baran in sod., 2010). Menadion povzroči značilne oksidativne poškodbe, med drugim poškodbe makromolekul, porušenje kalcijeve homeostaze, izčrpanje celičnih tiolnih zalog, peroksidacijo lipidov, destabilizacijo lizosomov ter končno celično smrt (Baran in sod., 2010). Pokazano je bilo, da je celična smrt, sprožena z menadionom, odvisna od njegove koncentracije in ko je ta primerna, poteče apoptoza (Chiou in sod., 2003). Slika 7 prikazuje shemo poteka dveh apoptotskih poti, sproženih preko nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti kot posledice delovanja menadiona.



Slika 7: Oksidativni stres (menadion) v pankreatičnih acinarnih celicah vodi do sprožitve apoptoze preko mitohondrijev in lizosomov. Povzeto po (Baumgartner in sod., 2007).

1.2.3 Proteini Bcl-2

Zgodnje študije apoptoze, sprožene zaradi poškodb v celici, so pokazale, da prekomerna ekspresija mitohondrijskega proteina Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) prepreči celično smrt (Hockenbery in sod., 1990). Protein Bcl-2 je član istoimenske družine proteinov, ki so pomembni regulatorji celične smrti in preživetja (Cory & Adams, 2002). Glede na njihovo strukturo in vlogo jih razdelimo na antiapoptotske, ki zavirajo apoptozo, in proapoptotske, ki pospešujejo apoptozo (Chipuk in sod., 2010).

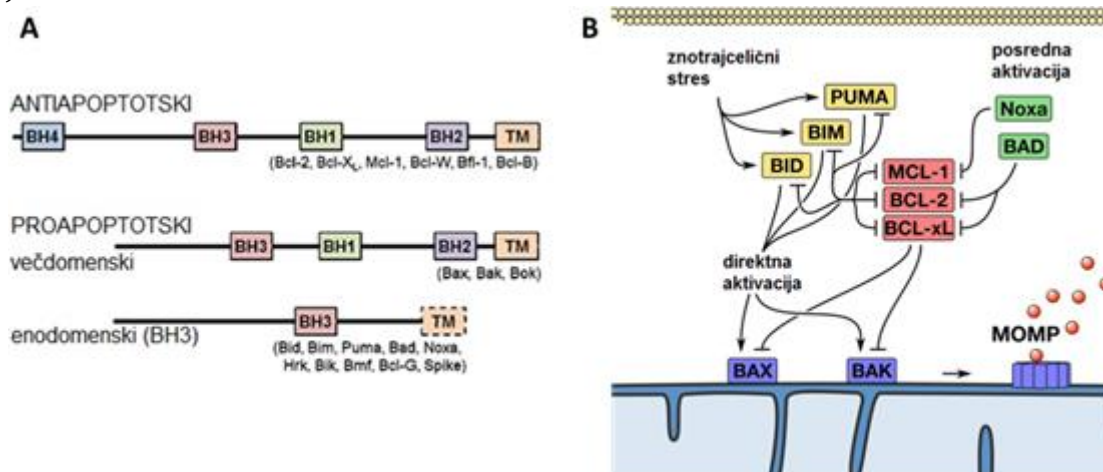
Vsak član Bcl-2 družine vsebuje vsaj eno BH (Bcl-2 homology) domeno. Med antiapoptotske proteine s štirimi BH domenami uvrščamo proteine Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w,

Mcl-1 in A1. Nahajajo se v jedrni membrani in membrani endoplazemskega retikuluma ter v citosolu (Boehning in sod., 2003). Družino proapoptotskih proteinov razdelimo na dve podskupini. V prvo uvrščamo proteine s tremi BH domenami, to so Bax, Bak, Bok, in še nekaj drugih proteinov. Drugo podskupino tvorijo proteini, ki imajo le eno BH domeno (BH3-only), in sicer Bid, Puma, Noxa, Bim, Bad in ostali. Z izjemo Bax-a, ki je prisoten tudi v mitohondrijski membrani, se vsi proapoptotski proteini nahajajo v citosolu (Adams & Cory, 1998; Gross in sod., 1999; Kaufmann & Hengartner, 2001) (slika 8A).

Občutljivost celic na apoptozo določa razmerje med antiapoptotskimi in proapoptotskimi proteini. Antiapoptotski proteini z vezavo na proapoptotske proteine in sledečo heterodimerizacijo zavirajo apoptozo (Chou in sod., 1999; Danial & Korsmeyer, 2004).

Večdomenska proapoptotska proteina Bax in Bak lahko tvorita pore v mitohondrijski membrani. Aktivirata se bodisi neposredno z vezavo aktivatorjev iz skupine proapoptotskih proteinov z eno (BH3) domeno (Bid, Bim, Puma) bodisi posredno, ko sta Bax in Bak najprej v neaktivnem kompleksu povezana z antiapoptotskimi Bcl-2 proteini. Proapoptotski proteini, ki imajo le BH3 domeno, pa nato z vezavo na te Bcl-2 proteine proteina Bax in Bak sprostijo (Brenner & Mak, 2009). Protein Bak se npr. nenehno prenaša v zunanjo mitohondrijsko membrano, kjer ga inhibira napetostno odvisni anionski kanalček VDAC2. Aktivatorji tBid, Bim ali Puma lahko prekinajo povezavo Bak-VDAC2 ter s tem omogočijo oligomerizacijo in tvorbo pore. Podobno se zgodi pri proteinu Bax, katerega C-končna vijačnica $\alpha 9$ preprečuje dimerizacijo. Struktura proteina se spremeni, ko se na N-končno vijačnico $\alpha 1$ vežejo tBid, Bim ali Puma, z vijačnico $\alpha 9$ pa se Bax vgradi v mitohondrijsko membrano (Kim in sod., 2009). Bax lahko tvori pore sam ali pa v povezavi z Bak-om ali tBid-om (Kuwana in sod., 2002). Pore omogočajo permeabilizacijo membrane in prehod proapoptotskih molekul v citosol (Shi, 2001).

Ob normalnih pogojih v celici se proapoptotski proteini z eno BH3 regijo v citosolu nahajajo v neaktivni obliki in delujejo kot senzorji apoptotskih signalov. Aktivirajo se lahko s cepitvami, defosforilacijo ali na nivoju transkripcije. Bid lahko cepijo kaspaza-8, grancim B, katepsini in kalpaini (Chen in sod., 2001; Cirman in sod., 2004; Li in sod., 1998; Luo in sod., 1998; Mandić in sod., 2002; Stoka in sod., 2001). Pomanjkanje rastnih faktorjev vodi v defosforilacijo proteina Bad, ki se nato veže na antiapoptotske proteine (Datta in sod., 1997). Razne poškodbe DNA pa vodijo v aktivacijo proteina p53, ki sproži transkripcijo proteinov PUMA, Noxe in proteina Bim (Borner, 2003; Puthalakath & Strasser, 2002) (slika 8B).



Slika 8: (A) Razdelitev proteinov družine Bcl-2 in (B) shema povezav med antiapoptotskimi in proapoptotskimi Bcl-2 in njihova vloga v apoptozi. Povzeto po (Elkholi in sod., 2014; Yip & Reed, 2008).

1.3 Lizosomi v apoptozi

Lizosomi so znotrajcelični organeli, ki imajo ključno vlogo v celični razgradnji. Membranske protonske črpalke na njihovih membranah ustvarjajo kislo okolje znotraj lizosomov (pH 4,6–5,0), ki je optimalno za delovanje lizosomskih hidrolaz, med katere uvrščamo fosfataze, glikozidaze, sulfataze, lipaze, nukleaze in proteaze (Huotari & Helenius, 2011; Saftig & Klumperman, 2009). Najbolj znane in najpomembnejše hidrolaze iz družine proteaz so katapsini (grško: prebaviti) (Turk & Turk, 2009).

Medtem ko so lizosomi in lizosomalne proteaze nepogrešljivi v procesu avtofagije, njihova razgradnja pa predstavlja ključen, ireverzibilen korak pred razpadom plazmaleme v procesu nekroze, je njihova vloga v apoptozi nekoliko kontroverzna (Česen in sod., 2012). Starejše domneve so lizosomom pripisovale vlogo v apoptozi v obsegu razgradnje apoptotskih teles (Ferri & Kroemer, 2001; Leist & Jaattela, 2001), delovanje lizosomskih proteaz pa naj bi bilo omejeno na nespecifično razgradnjo celičnih proteinov. S spoznanjem o možnosti le delne permeabilizacije lizosomalne membrane pa so začeli lizosomom pripisovati pomembnejše vloge v apoptozi (Guicciardi in sod., 2004). Količina sproščenih encimov v citosol pri delni permeabilizaciji lizosomalne membrane je namreč zadostna, da preseže zaščitno delovanje citosolnih inhibitorjev (Kirkegaard & Jaattela, 2009; Aits in Jaattela, 2013) in kaže na to, da lizosomalni encimi lahko sodelujejo v apoptozi.

1.3.1 Mehanizmi permeabilizacije lizosomalne membrane

Številne endogene in sintetične molekule lahko sprožijo permeabilizacijo lizosomalne membrane (LMP) (Boya & Kroemer, 2008; Repnik in sod., 2012; Stoka in sod., 2007).

Direktni endogeni ali sintetični sprožilci LMP so agensi, poimenovani lizosomotropiki. Po protonaciji se ujamejo in kopičijo v lizosomih, dokler ne dosežejo kritične koncentracije in delujejo membranolitično, kar vodi v sprostitve lizosomalne vsebine v citosol (Miller in sod., 1983; Repnik in sod., 2012). Sfingomielin je predstavnik endogenih lizosomotropikov, ki se s pomočjo kisle sfingomielinaze (ASMase) in ceramidaze v lizosomskih membranah pretvori v ceramid in dalje v sfingozin. Nastajanje sfingozina je povečano pri apoptozi, sproženi s TNF, akumulacija tako sfingozina kot ceramida pa vodi v sproženje LMP. Pokazano je bilo tudi, da ceramid lahko regulira aktivnost katapsina D (katD), kar privede do apoptoze s cepitvijo proteina Bid (Mohamed & Sloane, 2006). Najbolj proučen sintetičen lizosomotropik pa je dvoaminokislinski metilni ester Leu-LeuOMe, ki ima imunosupresivne lastnosti in je v kliničnem testiranju za zdravljenje zavrnitvene reakcije po presaditvi kostnega mozga (Hsieh in sod., 2002; Thiele & Lipsky, 1986).

V določenih primerih pride do destabilizacije lizosomalne membrane kot posledica delovanja spojin, ki imajo lastnosti detergentov ali pa kot posledica razgradnje specifičnih visoko glikoziliranih membranskih proteinov, ki sicer stabilizirajo membrane lizosomov (Serrano-Puebla & Boya, 2016).

Pomembni endogeni sprožilci LMP so ROS, ki nastanejo zaradi oksidativnega stresa v mitohondrijih (Kurz in sod., 2008). Nastali vodikov peroksid preide v bližnje lizosome, kjer se kopiči z železom bogat avtofagiran material. V Fentonovi reakciji nastajajo visokoreaktivni hidroksilni radikali, ki povzročijo peroksidacijo membranskih lipidov in posledično sprostitve lizosomalne vsebine v citosol. Sproščeni encimi poškodujejo mitohondrijske membrane s cepitvijo Bcl-2 proteinov, kar še dodatno pospeši nastajanje ROS. Ustvarjena pozitivna povratna zanka vodi v nove poškodbe lizosomov (Terman in sod., 2006; Zhao in sod., 2003). ROS lahko poškodujejo membrane celičnih organelov tudi preko aktivacije fosfolipaze A2 (PLA2), ki destabilizira membrane z razgradnjo membranskih fosfolipidov (Chwieralski in sod., 2006). Tudi delovanje siramezina (antagonist sigma-2 receptorja) je povzročilo oksidativni stres in naj bi privedlo do LMP in celične smrti (Ostenfeld in sod., 2005), a je bilo kasneje pokazano, da celično smrt sproženo s siramezinom povzroči destabilizacija mitohondrijske membrane in je neodvisna od LMP in sprostitve katapsinov v citosol (Česen in sod., 2013).

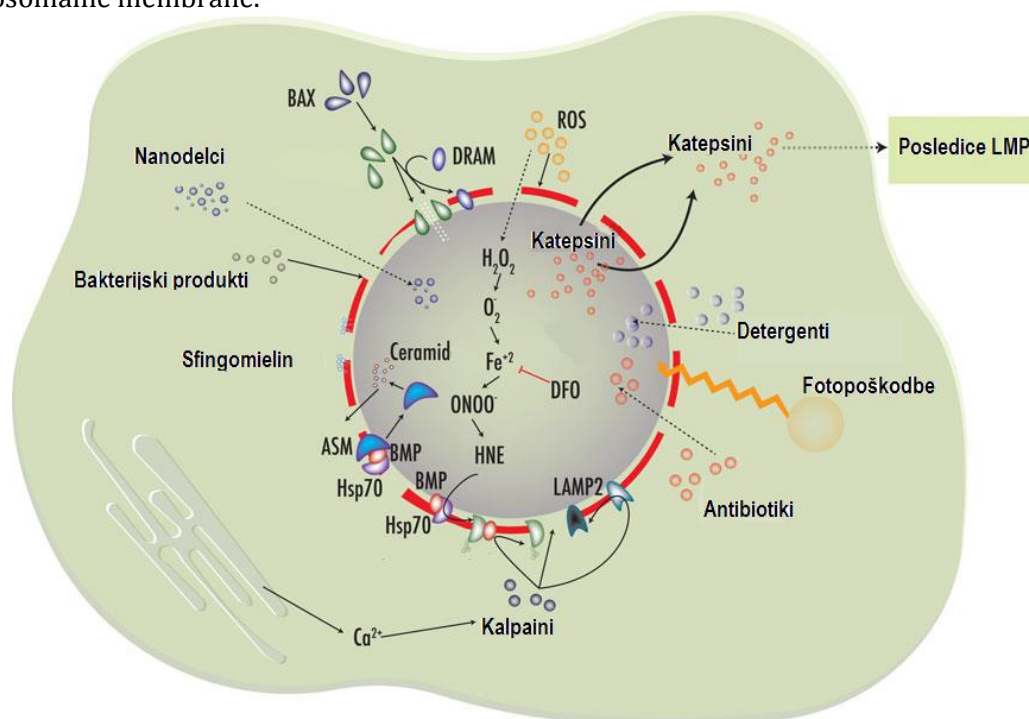
Domneva se tudi, da lahko proapoptotska proteina Bax in Bak tvorita pore na lizosomih, podobno kot na zunanji mitohondrijski membrani. Glede tega obstaja več teorij, in sicer bi lahko prišlo do tvorbe por na podoben način, kot se tvorijo na mitohondriju, kar bi omogočilo sprostitve lizosomalne vsebine v citosol (Kagedal in sod., 2005; Werneburg in

sod., 2007). Nadalje bi lahko konformacijska sprememba proteina Bax, ki so jo opazili pri apoptozi, sproženi s prostimi maščobnimi kislinami, omogočila prenos na lizosomsko membrano (Feldstein in sod., 2006). Translokacijo proteina Bax na lizosomalno membrano povezujejo tudi s proteinom DRAM1 (angl. DNA damage-regulated autophagy modulator 1), ki se nahaja v lizosomalni membrani in je udeležen v uravnavanje autofagije ter apoptoze (Crichton in sod., 2006). Nedavna študija pa je pokazala tudi možnost, da se proteina Bax/Bak preneseta v lizosom kot posledica avtofagnega prenosa poškodovanih mitohondrijev (Oberle in sod., 2010). Kljub temu zaradi nasprotujočih si študij vloga Bax in Bak ostaja vprašljiva.

Z LMP povezujejo tudi številne druge dražljaje, kot so močni svetlobni dražljaji, kinolonski antibiotiki, proste maščobne kisline, žolčne soli, sfingozin, določeni virusni proteini, inhibitorji protonskih črpalk in celo citotoksini iz kobrinega strupa (Boya & Kroemer, 2008; Repnik in sod., 2012, Serrano-Puebla in Boya, 2016).

Z LMP pogosto povezujejo kalpaine, ki so s kalcijem aktivirane citosolne cisteinske proteaze (Serrano-Puebla in Boya, 2016). Kalpaine namreč cepijo nekatere proteine, ki so odgovorni za stabilizacijo lizosomov, kot na primer Hsp70, ki preprečuje LMP z vezavo na BMP (bis(monoacilglicerol)fosfat), ki se nahaja v lizosomalni membrani (Petersen, 2010). Aktivacija kalpainov zmanjša vezavo HSP70 na BMP in s tem zmanjša aktivnost kisle sfingomielinaze in vodi v LMP ter izpust katepsina B v citosol (Zhu in sod., 2014). V določenih fizioloških pogojih pa so tarča kalpainov tudi LAMP2 in podenota B ATP-azne protonske črpalke (Villalpando Rodriguez & Torriglia, 2013).

V LMP pa so posredno udeleženi tudi sami lizosomalni encimi. Pokazali so, da izguba stres-inducibilnega šaperona Hsp70, ki ima pomembne antiapoptotske funkcije, sproži spuščanje lizosomskih encimov v citosol in od kaspaz neodvisno apoptozo (Nylandsted in sod., 2004). Pokazano je bilo tudi, da povišana aktivnost katepsinov razpolovi življenjsko dobo lizosomskih membranskih proteinov Lamp-1 in Lamp-2 in s tem poškoduje lizosomalne membrane (Ferri & Kroemer, 2001). Nadalje študije na celicah z izbitim genom za katepsin B dokazujejo, da je LMP manj obsežna po indukciji apoptoze s $\text{TNF}\alpha$ v primerjavi s celicami divjega tipa (Baskin-Bey in sod., 2005). Serinski proteazni inhibitor 2A (Spi2A), ki spada v skupino serpinov in inhibira katepsin B, prav tako zmanjša destabilizacijo lizosomov (Liu in sod., 2003). Na sliki 9 so prikazani mehanizmi permeabilizacije lizosomalne membrane.



Slika 9: Mehanizmi permeabilizacije lizosomalne membrane. Povzeto po (Serrano-Puebla in Boya, 2016).

1.3.2 Katepsini

Predstavnik katepsinov razdelimo glede na njihov mehanizem delovanja na serinske proteaze (katepsina A in G), aspartatne proteaze (katepsina D in E) in cisteinske proteaze (B, C, F, H, K, L, O, S, V, X/Z in W). Z izjemo katepsinov E in G se katepsini nahajajo v kisljih celičnih organelih, in sicer lizosomih ter endosomih. KatD in nekateri cisteinski katepsini (B, L, C, H, F) so prisotni v vseh celicah organizma in količinsko najštevilčnejše zastopani katepsini (Turk in sod., 2012). Po drugi strani pa je količina in lokalizacija določenih katepsinov (S, K, W) odvisna od vrste tkiva in tipa celice (Brix in sod., 2008; Turk in sod., 2002c).

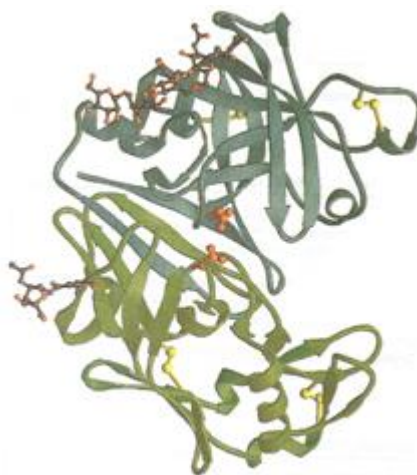
Sprva je bila vloga katepsinov omejena na razgradnjo endocitiranega in avtofagocitiranega materiala znotraj lizosomov. Kasneje so pokazali, da so katepsini sposobni visoko specifične in usmerjene proteolize ter da so lahko prisotni tudi v drugih celičnih kompartmentih (Brix in sod., 2008; Turk in sod., 2012). Odkrite so bile številne nove vloge katepsinov, kot so procesiranje hormonov in antigenov, kostno in tkivno modeliranje, aktivacija rastnih faktorjev in proencimov ter sodelovanje pri vnetnem odzivu (Brix in sod., 2008; Conus & Simon, 2010; Jacobson in sod., 2013; Reiser in sod., 2010; Turk in sod., 2012). Številni apoptotski dražljaji sprožijo LMP, sproščeni katepsini pa v citosolu sodelujejo v apoptozi (Boya & Kroemer, 2008; Česen in sod., 2012; Repnik in sod., 2014). Katepsini se lahko izločajo tudi v ekstracelularni prostor, kjer razgrajujejo proteine ekstracelularnega matriksa, kot so kolagen, fibronektin, proteoglikan in laminin (Fonović & Turk, 2014). Poleg njihovih fizioloških vlog katepsine povezujejo z nekaterimi patološkimi stanji, med drugim kardiovaskularnimi boleznimi, osteoporozo, revmatoidnim artritisom, aterosklerozo ter rakom (Benes in sod., 2008; Fonović & Turk, 2014; Turk in sod., 2012).

1.3.2.1 Katepsin D

KatD je znotrajcelična lizosomalna aspartatna proteaza, ki jo uvrščamo v pepsinsko naddružino in papainsko družino peptidaz A1 klana AA (klasifikacija po MEROPS-u (Rawlings in sod., 2004), kamor spadajo tudi njemu sorodne endopeptidaze katepsin E, pepsin A, renin in druge.

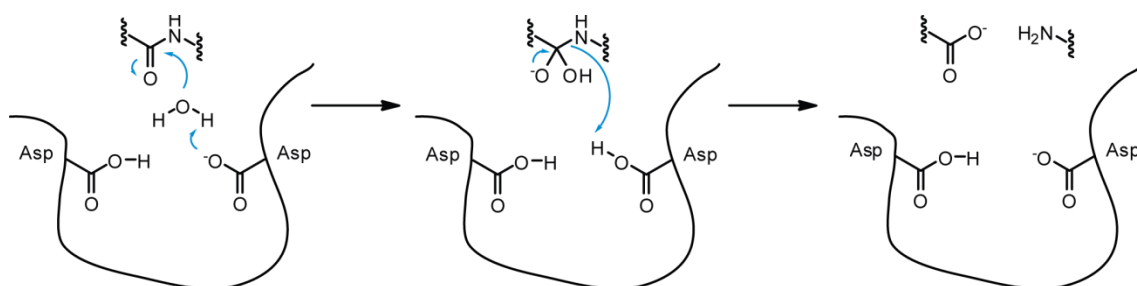
1.3.2.1.1 Sinteza, struktura in fiziološka vloga katD

KatD se sintetizira na zrnatem endoplazemskem retikulumu kot enoverižni preproencim, sestavljen iz N-terminalnega signalnega peptida, propeptida in katalitične domene (Erickson, 1989; Gieselmann in sod., 1983). Preprokatepsin D se nato glikozilira in transportira v Golgijev aparat, kjer se na glikozilirani mesti vežejo manozni ostanki (Man-6P). Preko manoznega receptorja se encimski kompleks prenese do lizosomov, kjer se receptorji odcepijo in reciklirajo, pro-katepsin D (52 kDa) pa se procesira do enoverižnega aktivnega intermedijata (48 kDa) in končno do zrele, dvoverižne endopeptidaze, sestavljene iz N-terminalne lahke verige (14 kDa) ter C-terminalne težke verige (34 kDa), ki ju povezujejo hidrofobne interakcije (Baranski in sod., 1991; Cantor in sod., 1992; Gieselmann in sod., 1983). In vitro je bilo pokazano, da so v procesiranje katD vključeni cisteinski katepsini (Samarel in sod., 1989) ter da poteka neodvisno od lastne katalitične funkcije oz. avtoaktivacije, odvisno pa je od katepsina B in L (Laurent-Matha in sod., 2006).



Slika 10: Zvitje zrele strukture katepsina D. N-terminalna domena je označena modro, C-terminalna domena pa zeleno. Aspartatna aminokislinska ostanka sta označena rdeče, disulfidne vezi pa so rumene. Povzeto po (Metcalf & Fusek, 1993).

KatD je sestavljen iz dveh domen, pri čemer vsaka prispeva po en aspartatni aminokislinski preostanek in skupaj tvorita aktivno mesto katD, kamor se veže do osem preferenčno hidrofobnih aminokislinskih preostankov (slika 10) (Metcalf & Fusek, 1993). Njegov mehanizem delovanja je splošna kislinsko-bazična kataliza, pri čemer je v vlogi nukleofila molekula vode (slika 11). Za svoje optimalno delovanje potrebuje kislo okolje, ki ga najdemo v lizosomih (Barrett, 1979). Pri sesalcih ni znanega endogenega inhibitorja katD. Poznan pa je naravni inhibitor aspartatnih proteaz, pepstatin A, izoliran iz različnih sevov aktinomiset (Umezawa in sod., 1970), ki deluje kot nekovalenten, kompetitiven inhibitor.



Slika 11: Mehanizem delovanja aspartatnih proteaz. Povzeto po (Suguna in sod., 1987).

KatD je splošno prisoten v vseh vrstah celic in tkiv. Sprva so ga povezovali le z nespecifično razgradnjo proteinov v lizosomih. Raziskave v zadnjih dveh desetletjih pa so pokazale, da je katD multifunkcijski encim in je udeležen v številnih bioloških procesih (Khalkhali-Ellis & Hendrix, 2014). Odgovoren je za selektivne in omejene cepitve substratov, ki so ključni za pravilno delovanje celic. Gre namreč za proteolitske dogodke, ki kontrolirajo pomembne biološke procese, kot so napredovanje celičnega cikla, diferenciacija, migracija, morfogeneza in tkivno modeliranje, imunološki procesi, ovulacija, oploditev, nevronska razrast, angiogeneza in apoptoza. Pomembna vloga katD v naštetih procesih se odraža v resnosti obolenj, nastalih zaradi pomanjkanja encima, spremenjene regulacije delovanja ali posttranslacijskih modifikacij. Pomembne patološke posledice so rakava, nevrolška in kožna obolenja ter ateroskleroza (Khalkhali-Ellis & Hendrix, 2014).

Novejše raziskave so odkrile nove vloge katD v fizioloških procesih, ki nadgrajujejo in se razlikujejo od njegovih hišnih (*angl.* Housekeeping) vlog. KatD namreč lahko deluje tudi v citosolu in v ekstracelularnem okolju, kjer so ga detektirali v bioloških tekočinah, kot so mleko, serum, znoj, urin, semenska tekočina in druge (Davies & Messer, 1984; Zuhlsdorf in sod., 1983). Encimsko neaktiven prokatepsin D izločajo številne celice, kot so makrofagi,

keratinociti, epitelijske celice mlečnih žlez in izvorno različne rakave celice. Izločen prokatepsin D deluje kot avtokrini ali parakrini mitogen pri rakavih celicah, fibroblastih ter keratinocitih (Benes in sod., 2008).

Aktivne oblike katD se lahko skupaj z drugimi lizosomalnimi proteazami sprostijo v citosol kot posledica apoptotskega dražljaja (Turk in sod., 2002a).

1.3.2.2 Cisteinski katepsini

Poznamo 11 človeških cisteinskih katepsinov (B, C, F, H, K, L, O, S, V, X/Z in W) (Turk in sod., 2002b; Turk in sod., 2001). Uvrščamo jih v skupino papainu podobnih encimov v klan CA in družino C1 (klasifikacija po MEROPS-u (Rawlings in sod., 2004)). V aktivnem mestu sta aminokislinska preostanka cistein in histidin. Za svoje optimalno delovanje potrebujejo kislo okolje, ki ga najdemo v lizosomih in endosomih (Turk in sod., 2012). Poimenovanje ter katalitske lastnosti človeških cisteinskih katepsinov so povzete v tabeli 1.

Tabela 1: Poimenovanje in katalitske lastnosti človeških cisteinskih katepsinov. Povzeto po (Turk in sod., 2012).

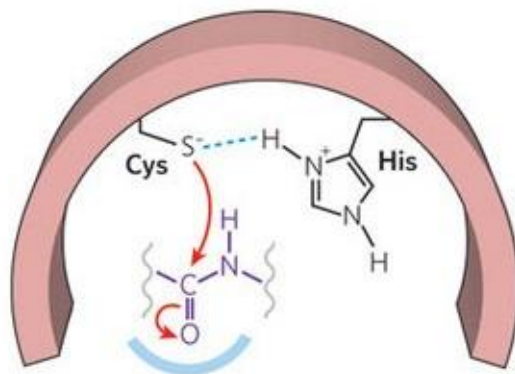
IME	VRSTA PEPTIDAZNE AKTIVNOSTI
katepsin L	endopeptidaza
katepsin V	endopeptidaza
katepsin S	endopeptidaza
katepsin K	endopeptidaza
katepsin F	endopeptidaza
katepsin B	endopeptidaza in karboksidiptidaza
katepsin H	endopeptidaza in aminomonopeptidaza
katepsin X/Z	karboksिमonopeptidaza
katepsin C	aminodipeptidaza
katepsin W	ni znano
katepsin O	ni znano

1.3.2.2.1 Sinteza, struktura in fiziološka vloga cisteinskih katepsinov

Sinteza cisteinskih katepsinov poteka na zrnatem endoplazemskem retikulumu v obliki preproencimov, in sicer se ob prehodu v endoplazemski retikulum signalni peptid odcepi, hkrati pa poteče glikozilacija N-konca molekule.

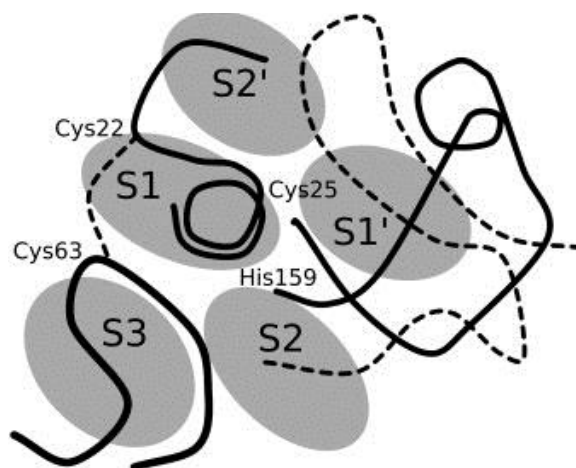
Propeptid omogoča pravilno zvijanje proteina in prehod v endosome/lizosome s pomočjo manoznega receptorja, obenem pa služi kot inhibitor proteolitične aktivnosti proencima (Twining, 1994). V endosomu katepsini postanejo aktivni po odcepitvi receptorjev ter propeptida. Kislo pH v lizosomu/endosomu oslabi interakcije med propeptidom in encimom. Zaradi tega imajo že nekateri proencimi, npr. prokatepsina B in L, nizko katalitično aktivnost, ki je ravno zadostna za avtokatalitično aktivacijo (Pungerčar in sod., 2009; Turk in sod., 2000). Prisotnost glikozaminoglikanov v lizosomih še pospeši proces aktivacije (Vasiljeva in sod., 2005). Na ta način se lahko odcepi propeptid endopeptidaz, medtem ko eksopeptidaze za aktivacijo potrebujejo cepitev z drugimi molekulami (Dahl in sod., 2001; Turk in sod., 2001).

Cisteinski katepsini so po večini majhne molekule velikosti približno od 24-35 kDa, z izjemo katepsina C, ki je oligomeren encim z molsko maso približno 200 kDa. Sestavljeni so iz dveh domen, in sicer domeno L (levo, angl. left) tvorijo tri alfa vijačnice, domeno R (desno, angl. right) pa antiparalelna beta ploskev sodčku podobne strukture. Aktivno mesto je med domenama in ima obliko črke V. Cisteinski amonokislinski preostanek (Cys25) se nahaja v levi domeni na N-terminalnem delu alfa vijačnice, histidinski (His159) pa na desni domeni na nasprotni strani žepa. V aktivnem encimu sta aminokislinska ostanka nabita in tvorita tiolat-imidazolni ionski par (Turk in sod., 2001). Mehanizem delovanja cisteinskih katepsinov vključuje deprotonacijo Cys25 s strani His159, čemur sledi nukleofilni napad deprotoniranega cisteinovega žvepla na karbonilni ogljik v substratu (slika 12).



Slika 12: Mehanizem delovanja cisteinskih proteaz. Povzeto po (Erez in sod., 2009).

Cisteinski katepsini imajo široko substratno specifičnost. Substrate cepijo učinkovito, kadar je na mestu cepitve določen tip aminokislinskega preostanka, ne zahtevajo pa določene aminokisline ali točno določenega zaporedja. Pomembna so predvsem substratna vezavna mesta S1, S2 in S1' (Turk in sod., 1998). Pokazano je bilo, da se na mesto S2 vežejo pretežno manjše alifatske aminokisline (valin, levcin, izolevcin), na mesto S1 pa bazične aminokisline (lizin in arginin) (Vidmar in sod., 2017) (slika 13).



Slika 13: Shematski prikaz substratnih vezavnih mest v aktivnem mestu cisteinskih proteaz. Substratna vezavna mesta se nahajajo na levi (S1, S3, S2') in desni (S2, S1') strani reže v aktivnem mestu. Povzeto po (Turk in sod., 2012).

Poleg razgradnje proteinov v lizosomih imajo tudi cisteinski katepsini še druge pomembne fiziološke vloge v celici (Turk in sod., 2000). Predvsem njihova prisotnost ni omejena le na endosomski/lizosomski sistem, kot so sprva domnevali, temveč se nahajajo tudi izven lizosomov v citosolu, jedru, na plazmalem ali v zunajceličnem prostoru, kjer so omejen čas tudi aktivni (Goulet in sod., 2004; Reiser in sod., 2010; Stoka in sod., 2007; Turk,

2006; Turk & Stoka, 2007; Zavašnik-Bergant & Turk, 2006). Tako sodelujejo pri procesiranju in aktivaciji različnih proteinov. Udeleženi so v stopenjsko procesiranje invariantne verige (MHC-II posredovano predstavljanje procesiranih antigenov), diferenciaciji keratinocitov, aktivaciji prohormonov, preoblikovanju kostnine in drugih vrst zunajceličnega matriksa, signalizaciji v jedru (procesiranje histonov) in v drugih procesih (Brix in sod., 2008; Turk & Stoka, 2007). Zelo specifične vloge imajo predvsem katepsini z omejenim izražanjem v določenih tipih celic ali tkiv (npr. katepsina S in W v imunskih celicah in katepsin K v osteoklastih). Podobno kot velja za aspartatno proteazo katD, tudi nekontrolirana aktivnost cisteinskih katepsinov vodi v razvoj različnih patoloških stanj, med njimi so najpomembnejša rakava obolenja, nevrodegenerativne bolezni, ateroskleroza in revmatoidni artritis (Reiser in sod., 2010; Vasiljeva in sod., 2007).

1.3.2.3 Uravnavanje delovanja katepsinov

Katepsini kot proteolitski encimi predstavljajo potencialno nevarnost za celico. Proteoliza mora biti tako natančno nadzorovana. Aktivnost katepsinov se uravnava na več ravneh, in sicer se sintetizirajo kot neaktivni proencimi; nahajajo se v lizosomih in endosomih, ki so od citosola ločeni s polprepustno membrano; njihova aktivnost pa je pogojena s kislim pH (Turk in sod., 1997; Turk in sod., 2001).

V citosolu sčasoma pride do ireverzibilne inaktivacije katepsinov kot posledice deprotonacije His159 (cisteinski katepsini) oz. Asp (katD), čemur nato sledi prekinitev nekaterih elektrostatskih interakcij in končno porušenje terciarne strukture (Turk in sod., 1993a; Turk in sod., 1994b). Izjemo predstavlja katepsin S, ki je stabilen v nevtralnem in celo rahlo bazičnem okolju pri pH vrednostih nad 8 (Kirschke in sod., 1989). Po drugi strani lahko različni ligandi, kot npr. substrati katepsinov in glikozaminoglikani, katepsine v citosolu stabilizirajo in s tem podaljšajo njihovo aktivnost izven lizosomov (Turk in sod., 2002b; Turk in sod., 2000).

Najpomembnejši regulatorji delovanja katepsinov pa so njihovi endogeni inhibitorji (Turk in sod., 1997; Turk in sod., 2001).

1.3.2.3.1 Endogeni inhibitorji cisteinskih katepsinov

Endogeni inhibitorji cisteinskih katepsinov so po večini kompetitivni, kar pomeni, da se vežejo v aktivno mesto encima in s tem preprečijo, da bi se tja vezal substrat. Med endogene inhibitorje katepsinov prištevamo $\alpha 2$ makroglobulin, ki je splošen inhibitor iz krvne plazme, ter inhibitorje iz naddružine cistatinov. Na podlagi sekvenčne homologije cistatine delimo v štiri družine. V prve tri spadajo inhibitorni proteini stefini, cistatini in kininogeni (Barrett in sod., 1986; Turk & Bode, 1991; Turk in sod., 2008), v četrti družini pa so neinhibitorni homologi cistatinov, kot so fetuini in s histidinom bogati glikoproteini (Jones in sod., 2005; Reynolds in sod., 2005).

Stefini so enoverižni, neglikozilirani proteini, z molsko maso približno 11 kDa (Turk & Bode, 1991). Po večini se nahajajo znotraj celice, najdemo pa jih tudi v telesnih tekočinah (Abrahamson in sod., 1986). Glavna predstavnika stefinov sta stefin A, ki ga najdemo predvsem v epitelnem in limfnem tkivu, in ubikvitaren stefin B (Turk in sod., 1997). Slednji ima nekoliko slabšo afiniteto vezave na cisteinske proteaze kot stefin A (posebej na katepsin B) (Turk in sod., 1993b; Turk in sod., 1997).

Cistatini so enoverižni proteini z molsko maso približno 13 kDa, ki se za razliko od stefinov izločajo iz celice. So reverzibilni kompetitivni inhibitorji (Turk in sod., 2000), ki se nespecifično vežejo na katepsine (Turk in sod., 2001).

Kininogeni so zunajcelični enoverižni glikoproteini, ki vsebujejo več domen za vezavo cisteinskih proteaz. Pri sesalcih obstajajo tri različne vrste kininogenov, in sicer H - kininogeni (high-Mr), L - kininogeni (low Mr) ter T kininogeni (DeLa Cadena & Colman, 1991).

Cisteinske proteaze inhibirajo tudi tiropini (fragment p41 invariantne verige MHC razreda II) in serpini, sicer inhibitorji serinskih proteaz (Turk in sod., 2002b; Turk in sod., 2012).

1.3.2.4 Katepsini v apoptozi

Kljub dejstvu, da imajo kaspaze vodilno vlogo v apoptozi, so novejša študija pokazale, da so ob zmernih poškodbah lizosomskih membran v signalizacijo apoptoze udeleženi tudi katepsini (Guicciardi in sod., 2004). Za razliko od kaspaz so katepsini aktivni takoj po sprostitvi v citosol in ne potrebujejo aktivacije (Turk & Stoka, 2007).

Pomembno je definirati, kje v apoptotski kaskadi pride do LMP, in sicer ali gre za zgoden, prožilni ali morda pozen, ojačevalen dogodek. Ko pride do LMP zaradi delovanja lizosomotropikov, je LMP prvi, kritičen korak. V nasprotnem primeru je LMP sprožen posredno kot posledica apoptotske kaskade (Repnik in sod., 2014). Sprva so bili LMP in katepsini umeščeni pred permeabilizacijo mitohondrijske membrane, vendar je večina teh prvotnih študij analizirala le končne točke pri napredovanju apoptoze, kjer so bili tako mitohondriji kot lizosomi obsežno poškodovani. Utišanje oziroma izbitje genov za katepsine pa je le zakasnilo apoptozo (Foghsgaard in sod., 2001; Guicciardi in sod., 2001; Nagaraj in sod., 2006; Werneburg in sod., 2007). Novejša raziskave pri apoptozi, sproženi z receptorji smrti, pa LMP opredelijo kot dogodek, ki sledi permeabilizaciji mitohondrijev in deluje kot pozitivna ojačevalna zanka (Bojič in sod., 2007; Oberle in sod., 2010; Wattiaux in sod., 2007).

Najpogostejše navajani substrat cisteinskih katepsinov je proapoptotski protein Bid (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008; Stoka in sod., 2001). Pomembno vlogo pri cepitvi proteina Bid naj bi imela katepsina B in L, sicer pa ima Bid med dvema alfa vijačnicama zanko, na kateri so cepitvena mesta katepsinov B, K, L, H in S na mestu Arg65 (Stoka in sod., 2001), katepsina H na mestu Arg71, kaspaze 8 na mestu Asp59, grancima B na mestu Asp75 in kalpainov na mestu Tyr47. Povzeto po (Repnik in sod., 2012). Pokazano pa je bilo tudi, da katepsini sodelujejo pri razgradnji antiapoptotskih proteinov iz družine Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), kar vodi v destabilizacijo mitohondrijske membrane (Blomgran in sod., 2007; Droga-Mazovec in sod., 2008).

Katepsini pa lahko sodelujejo tudi v signalni poti apoptoze, ki je neodvisna od poškodb mitohondrijske membrane. Pri apoptozi, inducirani z lizosomotropikom LLOMe, katepsini cepijo inhibitor apoptoze XIAP (Droga-Mazovec in sod., 2008).

Pomen katepsinov med apoptozo so ugotavljali tudi preko delovanja njihovih endogenih inhibitorjev. Pri delu z mišjimi celicami z izbitim genom za stefin B so ugotovili, da je apoptoza v možganih povečana (Pennacchio in sod., 1998) zaradi neuravnavanega delovanja cisteinskih katepsinov. Pri tovrstnih miših se v večji meri izraža katepsin S (Lieuallen in sod., 2001). Novejša študija pa stefinu B pripisujejo vlogo v oksidativnem stresu. Oksidativni stres namreč poveča izražanje stefina B, medtem ko je bilo pri miškah z izbitim genom za stefin B opaženo povečanje oksidativnih poškodb (peroksidacija lipidov) in zmanjšanje aktivnosti antioksidantov superoksid dismutaze ter glutationa (Lehtinen in sod., 2009). V skladu s tem so tudi izsledki nedavne raziskave, ki prav tako pokaže, da je vsebnost stefina B v celici obratno sorazmerno povezana z občutljivostjo celice na celično smrt, ki nastopi kot posledica oksidativnega stresa (Butinar in sod., 2014).

V preteklih letih je bilo pokazano, da je katD pomemben igralec v apoptozi, tako v fiziološkem kot patološkem kontekstu. Odvisno od celičnega tipa in pogojev v celici lahko katD sproži ali pa prepreči apoptozo (Minarowska in sod., 2007).

Proapoptotske lastnosti katD so lahko odvisne ali pa neodvisne od njegove katalitične aktivnosti (Deiss in sod., 1996; Kagedal in sod., 2001; Roberg & Ollinger, 1998). Kljub temu obstajajo nasprotujoča si mnenja glede proapoptotske vloge katD, ki izhajajo iz dvomov o njegovi možni aktivnosti v le rahlo kislem citosolu predapoptotičnih celic. KatD je namreč optimalno aktiven pri pH med 3,5 in 4. Medtem ko je bilo pokazano, da katD lahko cepi proapoptotski protein Bid pri pH 6,2 (Heinrich in sod., 2004), izsledki Ivanove temu nasprotujejo in kažejo, da nad pH 5 katD nima proteolitske aktivnosti (Ivanova in sod., 2008). Predlagano je bilo, da substrati z visoko afiniteto do katD lahko stabilizirajo aktivno obliko encima v nevtralnem pH na podoben način, kot to stori inhibitor katD, pepstatin A (Bidere in sod., 2003). Poleg tega je bilo predpostavljeno, da se Bid v času cepitve skupaj s katD nahaja v celičnih strukturah, podobnih endosomom (Heinrich in sod., 2004). Po drugi

strani je bilo pokazano, da tiredoksin-1 preide v lizosome tekom apoptoze, sprožene z vodikovim peroksidom, kjer ga katD cepi (Haendeler in sod., 2005).

Tako kot dvomi o aktivnosti katD v citosolu obstajajo tudi različna mnenja glede samega mehanizma sproženja apoptoze s strani katD. Tarča katD bi lahko bil Bid, pokazano je bilo namreč, da ga katD lahko cepi (Blomgran in sod., 2007; Heinrich in sod., 2004). Poleg tega je bilo nedavno odkrito, da katD specifično cepi Bid na treh mestih, in sicer Phe24, Trp48, and Phe183 (Appelqvist in sod., 2012). Kljub temu obstajajo raziskave, ki pokažejo, da Bid ni tarča katD (Cirman in sod., 2004; Droga-Mazovec in sod., 2008; Guicciardi in sod., 2004). Druge možne apoptotske tarče katD so Bax (Bidere in sod., 2003), prokaspaza -8 (Conus in sod., 2012) in Mcl-1 (Bewley in sod., 2011).

Antiapoptotske vloge katD so večinoma vezane na rakave celice. Zmanjšana ekspresija katD poveča občutljivost človeških nevroblastomskih celic na apoptozo, sproženo z doksorubicinom, obenem pa ima njegova prekomerna ekspresija nasproten učinek (Sagulenko in sod., 2008). V skladu s tem je bilo objavljeno, da inhibicija katD s pepstatinom A sproži apoptozo v nevroblastomski celični liniji (Castino in sod., 2007). Nedavno je bilo tudi pokazano, da inhibicija katD s pepstatinom A ali preko siRNA v kolorektalnih rakavih celicah pospeši apoptozo, sproženo z acetatom (Marques in sod., 2013; Oliveira in sod., 2015). Antiapoptotska vloga katD je bila opisana tudi pri fizioloških pogojih z uporabo miši z izbitim genom za katD (Koike in sod., 2003; Saftig in sod., 1995).

Poglavje 2

Namen dela

Katepsini so najbolj zastopani lizosomalni proteolitični encimi in sodelujejo pri nespecifični razgradnji proteinov znotraj lizosomov. Pokazano je bilo, da imajo tudi specifične fiziološke vloge, kot je uravnavanje apoptoze v citosolu. Kljub dejstvu, da imajo kaspaze vodilno vlogo v apoptozi, so novejša študija pokazale, da so ob zmernih poškodbah lizosomalnih membran v signalizacijo apoptoze udeleženi tudi katepsini. Natančni mehanizmi sprožitve in poteka celične smrti, ki vključuje poškodbe lizosomalnih membran, pa še vedno niso popolnoma razjasnjeni.

Kljub temu, da novejša raziskave pri apoptozi, sproženi z receptorji smrti, LMP opredelijo kot dogodek, ki sledi permeabilizaciji mitohondrijev in deluje kot pozitivna ojačevalna zanka, ostaja vloga katD v receptorsko sproženi apoptozi, katere primer je sprožilec apoptoze $\text{TNF}\alpha$, vprašljiva zaradi obstoječih nesoglasij glede njegovega prispevka k apoptotski kaskadi.

ROS so pomembni sprožilci apoptoze tako v fiziološkem kot v patološkem kontekstu. Pokazano je bilo, da oksidativni stres lahko sproži tako zunanjo pot apoptoze preko celičnih receptorjev kot tudi notranjo, mitohondrijsko pot apoptoze. Menadion (2-methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K3) kot izvor ROS povzroči značilne oksidativne poškodbe v celicah. Pokazano je bilo, da primerna koncentracija menadiona sproži apoptozo, sam mehanizem poteka tako sprožene apoptotske kaskade in predvsem vpletenost katepsinov v njej pa ostajata nerazjasnjena.

Naš namen je bil natančneje razjasniti mehanizem sprožitve apoptoze s fiziološkim sprožilcem apoptoze $\text{TNF}\alpha$ ter sprožilcem oksidativnega stresa menadionom ter obenem pojasniti vlogo katD v obeh primerih sprožene apoptoze.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1. Kemikalije

- Ac-DEVD-AFC (N-acetil-aspartat-glutamat-valin-aspartat-7-amino-4-trifluorometilkumarin; Bachem)
- Ac-IETD-AMC (N-acetil-izolevcin-glutamat-treonin-aspartat-7-amino-4-metilkumarin; Bachem)
- Akridin oranž (Sigma)
- Akrilamid-N,N-metilenenbisakrilamid (Serva)
- Annexin-V-PE kit (BD Pharmingen)
- APS (amonijev persulfat; Serva)
- Bz-RGFFP-4-MeO β NA (benzene-arginin-glicin-fenilalanin-fenilalanin-prolin-4-metoksi- β -naftilamin)
- CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-1-propransulfonat; Fluka)
- Cikloheksimid (Sigma)
- Digitonin (Sigma)
- DMSO (dimetilsulfoksid; Merck)
- DTT (ditiotreitol; Fermentas)
- E-64d (L-trans-epoksisukcinil-(OEt)-leu-3-metilbutilamid; Peptide)
- EDTA (Serva)
- Glutamin (Sigma)
- HEPES (Serva)
- Goveji serumski albumin (New England Biolabs)
- Menadion (Sigma)
- Mešanica inhibitorjev proteaz (Sigma)
- Mešanica penicilina in streptomicina (Sigma)
- MitoTracker CMX-Ros (Invitrogen)
- N-acetil cistein (Sigma)
- NaDS (natrijev dodecil sulfat; Serva)
- Nekrostatin-1 (Sigma)
- Označevalec velikosti proteinov: PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas)
- Pepstatin A-penetratin (Calbiochem; EMD Millipore)

- Posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne)
- Propidijev jodid (Sigma)
- Rekombinantne človeške kaspaze 3, 6, 7 (eksprimirane v *E.coli*)
- Rekombinantna človeška kaspaza 8 (Novus Biologicals, UK)
- Reagent ECL za kemiluminiscenco (Amersham Pharmacia Biotech)
- Reagent za določanje koncentracije proteinov (Biorad)
- Saharoza (Fluka)
- TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletilendiamin; Merck)
- TNF α (človeški rekombinantni TNF α ; ProSccec-Tany TechnoGene LTD; Rehovot, Israel)
- Trypsin (TrypLE Select) Gibco
- Tris (Serva)
- Tween-20 (Serva)
- Zarodni serum goveda FBS (Atlanta Biologicals)
- Z-Phe-Arg-AMC (N-benziloksikarbonil-L-fenilalanin-L-arginil-4-metil-7-kumarilamid; Bachem)
- Z-VAD-FMK (karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilketon; Bachem)

3.1.2. Protitelesa

- Primarna kunčja poliklonska protitelesa proti cepljeni obliki proteina BID (Abcam)
- Primarna kunčja poliklonska protitelesa proti proteinu BID (Cell Signaling)
- Primarna kunčja poliklonska protitelesa proti proteinu GAPDH (Abcam)
- Primarna kunčja poliklonska protitelesa proti kaspazi 8 (Santa Cruz)
- Primarna kunčja poliklonska protitelesa proti kaspazi 9 (Santa Cruz)
- Primarna mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu B (Kopitar-Jerala in sod., 2001)
- Primarna mišja monoklonska protitelesa proti katD (Kopitar-Jerala in sod., 2001)
- Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti cepljeni obliki proteina PARP (Abcam)
- Primarna kunčja poliklonska protitelesa proti stefinu B (Abcam)
- Primarna mišja monoklonska protitelesa proti aktinu (Sigma)
- Sekundarna kunčja antimišja in kozja antikunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)

3.1.3. Gojišča

- Gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (PAA, Gibco), obogateno z 10 % FBS, 1 % glutaminom in 1 % streptomycinom/penicilinom
- Gojišče F12, obogateno z 10 % FBS, 1 % glutaminom in 1 % streptomycinom/penicilinom (PAA, Gibco)
- Gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom in s HEPES-om (PAA), obogateno z 10 % FBS-HI, 1 % glutaminom in 1 % streptomycinom/penicilinom

3.1.4. Celice

- L929 – trajna mišja celična linija fibroblastov
- Makrofagi – diferencirane celice levkemijskega monocitnega limfoma
- SH-SY5Y – celice človeškega nevroblastoma
- THP-1 – celice človeške monocitne levkemije
- U87 – celice človeškega glioblastoma (astrocitoma)
- U937 – celice človeškega levkemijskega monocitnega limfoma

3.1.5. Pufri

Elektroforezni pufer za NaDS-PAGE

25 mM Tris
192 mM L-glicin
0,1 % NaDS

Kaspazni pufer (2X)

100 mM Tris
10 mM DTT
0,1 % CHAPS
10 % saharoza
pH 7,4

Pufer za rekombinantne kaspaze

50 mM HEPES
100 mM NaCl
0,1 % CHAPS
10 % saharoza
5 mM DTT
1 mM EDTA
pH 7 ali pH 6

5X Laemmlijev nanašalni pufer

62,5 mM Tris

50 mM DTT

2 % NaDS

10 % glicerol

0,002 % bromfenol modro

Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (6x)

300 mM Tris

100 mM NaDS

40 mM EDTA

1,2 M DTT

60 % (v/v) glicerol

0,3 % (w/v) bromfenol modro

Prenašalni pufer

25 mM Tris

192 mM L-glicin

20 % metanol

pufer PBS

145 mM NaCl

2,5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 7,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

pH 7,4

pufer RIPA

50 mM tris

100 mM NaCl

0,1 % (w/v) NaDS

1 % (v/v) NP-40

0,5 % (w/v) deoksilonska kislina

1 mM EDTA

pufer TBST

20 mM Tris

500 mM NaCl

0,5 % (v/v) Tween-20

Blokirni pufer

5 % (w/v) delež mleka v prahu v pufu TBS-T

Pufer z digitoninom – citosolni lizati za imunoprenos

75 µg/ml digitonin
 250 mM saharoza
 20 mM HEPES
 10 mM KCl
 1 mM MgCl₂
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 pH 7,5

Pufer z digitoninom – celotni celični lizati za merjenje katepsinske aktivnosti

400 µg/ml digitonin
 50 mM CH₃COONa
 0,5 mM EDTA
 150 mM NaCl
 pH = 5,6

Acetatni pufer za merjenje katepsinske aktivnosti

50 mM CH₃COONa
 0,5 mM EDTA
 150 mM NaCl
 pH = 3,5

3.1.6. Laboratorijska oprema

- Aparatura za prenos western P8DS Penguin™ (Owl Separation Systems)
- Avtomatska temnica SRX-101A (Konica Minolta)
- Avtomatske pipete P-20, P-100, P-200, P-1000 (Eppendorf)
- Centrifuge Eppendorf 5402, 5410, 5417R, 5415R, 5810R
- Centrifugirke (15 ml in 50 ml)
- Filmi Biomax Light Film (Kodak)
- Fluorimeter za mikrotitrne plošče Safire (Tecan)
- Inkubator za celične linije (Binder)
- Invertni fluorescenčni mikroskop IX71 (Olympus)
- Kaseta za razvijanje filmov X-omatic regular screens (Kodak)
- Komplet za elektroforezo v prisotnosti NaDS (Biorad)
- Laminar (Iskra PIO)
- Magnetna mešala MM-530 (Tehtnica)
- Nitrocelulozna membrana NC45 (Sigma)
- Oprema za delo s celicami (pipete, plošče za gojenje, centrifugirke ...) (TPP, Corning, Greiner)
- pH-meter (Metrel)
- Pretočni citometer FACSCalibur (Becton Dickinson)
 - Ekscitacijska svetloba: 488 nm
 - Emisijska svetloba, filtri : FL1: 515–545 nm
 - FL2: 564–606 nm
 - FL3: > 670 nm
- Vakuumska črpalka (ABM)
- Vodna kopel RM6 (Lauda)

3.2 Metode

3.2.1 Metode dela s celicami

3.2.1.1 Gojenje celic

Celične linije smo gojili v skladu s priporočili celične zbirke dobaviteljev (ATCC, American Type Culture Collection). Celice smo gojili v inkubatorju v nadzorovani atmosferi (37 °C, 5 % CO₂, atmosfera, nasičena z vodno paro).

3.2.1.2 Tripsinizacija in precepljanje celic

Ko so pritrjene celice dosegle 90 % preraščenost, smo odstranili izrabljeno gojišče, sprali celice z ogretim pufrom 1x PBS ter dodali raztopino TrypLE Select in tripsinizirali celice v CO₂ inkubatorju pri 37 °C. Po končani tripsinizaciji smo celice ob dodatku svežega gojišča centrifugirali in nacepili za poskus. Suspenzijske celice smo v skladu s priporočili proizvajalca znotraj priporočenega obsega gostote precepili tako, da smo celice prenesli v centrifugirko ter jih centrifugirali in resuspendirali v svežem gojišču.

3.2.1.3 Zamrzovanje in odmrzovanje celic

Zamrzovali smo ustrezno gostoto celic, saj določen odstotek celic zamrzovanja ne preživi. Celice (8×10^6 celic/mL) smo resuspendirali v gojišču za zamrzovanje (90 % FBS in 10 % DMSO), jih prenesli v kriogeno vialo in jih zamrzili pri -80 °C v posodi z izopropanolom, ki omogoča počasno ohlajanje s hitrostjo 1 °C/min. Odmrzovanje mora potekati hitro, in sicer smo vialo s celicami nemudoma prenesli v vodno kopel, ogreto na 37 °C, da so se celice odtalile. Nato smo celice prenesli v centrifugirko s svežim hladnim gojiščem in jih centrifugirali 5 min pri 120 rcf. Po centrifugiranju smo celice resuspendirali v svežem, ogretem gojišču in jih prenesli v ustrezno petrijevko/flask.

3.2.2 Sprožitev apoptoze s citokinom TNF α /CHX in menadionom

3.2.2.1 Določitev optimalne koncentracije TNF α in menadiona

Celice smo nacepili na ploščo s 24 vdolbinicami, tako da je bilo v vsaki vdolbinici 2×10^5 celic (makrofagi, THP-1, U-937) oziroma 1×10^5 celic (L929, SH-SY5Y, U87). Celice L929, SH-SY5Y in U87 smo inkubirali preko noči v inkubatorju pri 37 °C, da so se pritrdile. Po menjavi gojišča smo vanj dodali citokin TNF α in CHX ali menadion v različnih koncentracijah ter po 12 h določili delež apoptoze.

3.2.2.2 Sprožitev apoptoze

Celice smo resuspendirali v gojišču z dodatkom inhibitorja cisteinskih katepsinov E-64d (končna koncentracija 10 μ M), inhibitorja aspartatnih katepsinov PepA-P (končna koncentracija 1 μ M), inhibitorja kaspaz Z-VAD-FMK (končna koncentracija 20 μ M) ter antioksidanta NAC (končna koncentracija 0,5 mM ali 1 mM). Po 2-urni inkubaciji smo sprožili apoptozo s TNF α in CHX ali menadionom ter celice inkubirali pri 5 % CO₂ in 37 °C.

3.2.2.3 Določanje deleža apoptotskih celic

Zgodnje faze apoptoze določa izguba asimetrične porazdelitve membranskih fosfolipidov, sledi ji jedrna fragmentacija, kondenzacija kromatina ter fragmentacija DNK. Začetna izguba celične asimetrije vodi v izpostavitve fosfatidil serina (PS) na zunanjo stran celične membrane. Ta proces lahko spremljamo z uporabo konjugata Annexin V-PE. Annexin V je protein, ki se z visoko afiniteto veže na PS, fikoeritrin (PE) pa je fluorokrom, s pomočjo katerega lahko detektiramo vezavo. Kasnejše faze apoptoze določimo s propidijevim jodidom (PI), ki se veže na DNK ob njeni fragmentaciji. Membrane živih celic ne prepuščajo PI, ki obarva le pozno-apoptotske in mrtve celice. S kombinirano uporabo Annexin V-PE in PI na ta način določimo delež zgodnje- in pozno-apoptotskih celic.

Pritrjene celice smo najprej tripsinizirali in nato centrifugirali, suspenzijske pa takoj po končani inkubaciji prenesli v tubice za pretočno citometrijo ter jih centrifugirali 5 min pri 380 rcf. Gojišče smo odsesali in resuspendirali celice v 1 ml pufru PBS ter jih ponovno centrifugirali 5 min pri 380 rcf. Odsesali smo pufer in celice resuspendirali v pufru za vezavo konjugata Annexin-V-PE z dodatkom Annexina (končna koncentracija 0,2 μ g/ml) in jih inkubirali v temi. Po 15 min smo dodali še pufer za vezavo konjugiranega Annexin-V-PE z dodatkom PI (končna koncentracija 0,2 μ g/ml) ter pomerili fluorescenco označenega vzorca s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) po navodilih proizvajalca.

3.2.2.4 Določitev deleža celic s poškodovanimi mitohondriji

Poškodbe mitohondrijev smo ovrednotili s pomočjo kemikalije MitoTracker CMX-ROS, ki v reducirani obliki difundira preko plazmaleme ter se v metabolno aktivnih mitohondrijih oksidira. Ob oksidaciji se spremeni v fluorescentno obliko in fluorescira v rdečem območju. Ob poškodbi mitohondrijske membrane ter posledičnem znižanju membranskega potenciala se v mitohondrijih kopiči manj barvila in celice kažejo zmanjšano intenziteto rdeče fluorescence v primerjavi s celicami z intaktnimi mitohondriji.

Celicam U937 smo po končani inkubaciji dodali barvilo MitoTracker CMX-ROS v končni koncentraciji 50 nM ter jih 40 min inkubirali pri 37 °C, nato pa smo jih centrifugirali 5 min pri 380 rcf ter jih resuspendirali v 500 μ l pufru PBS. Na pretočnem citometru FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) smo pomerili rdečo fluorescenco (filter FL3).

3.2.2.5 Določitev deleža celic s poškodovanimi lizosomi

Poškodbe lizosomov smo ovrednotili s pomočjo kemikalije akridin oranž (AO), ki se zadržuje v organelih s kislim pH in fluorescira v rdečem območju. Ob poškodbi lizosomov se v njih akumulira manj barvila in celice kažejo zmanjšano intenziteto rdeče fluorescence v primerjavi s celicami z intaktnimi lizosomi.

Celice (U937) smo po končani inkubaciji dodali barvilo AO v končni koncentraciji 5 µg/ml ter jih 15 min inkubirali pri 37 °C, nato pa smo jih centrifugirali 5 min pri 380 rcf ter jih resuspendirali v 500 µl pufra PBS. Na pretočnem citometru FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) smo pomerili rdečo fluorescenco (filter FL3).

3.2.2.6 Priprava celotnega celičnega lizata

Celice (U937) smo po končani inkubaciji centrifugirali 5 min pri 380 rcf ter jih resuspendirali v 1 ml hladnega pufra PBS. Sledilo je ponovno centrifugiranje (5 min pri 380 rcf) ter resuspendiranje celic v lizirnem pufru. Za določanje katepsinske aktivnosti je bil to acetatni pufer z dodatkom digitonina (400 µg/ml), za določanje kaspazne aktivnosti RIPA pufer ter za pripravo lizatov za imunoprenos RIPA pufer z dodatkom mešanice inhibitorjev proteaz v razmerju 1:100 (v/v). Celične lizate smo 10–20 min inkubirali na ledu, nato pa smo jih centrifugirali 10 min pri 16000 rcf in 4 °C ter supernatante prenesli v nove epice in jih takoj uporabili v analizah.

3.2.2.7 Priprava citosolnega ekstrakta

Celice (U937) smo po končani inkubaciji centrifugirali 5 min pri 380 rcf ter jih resuspendirali v 1 ml hladnega pufra PBS. Sledilo je ponovno centrifugiranje (5 min pri 380 rcf) ter resuspendiranje celic v citosolnem pufru z dodatkom digitonina (75 µg/ml) ter mešanice inhibitorjev proteaz v razmerju 1:100 (v/v). Celične lizate smo 20 min inkubirali na ledu, nato pa smo jih centrifugirali 5 min pri 1000 rcf in 4 °C ter supernatante prenesli v nove epice in jih takoj uporabili v analizah.

3.2.2.8 Določanje celotne koncentracije proteinov v vzorcu

Koncentracijo proteinov v celičnih lizatih smo ovrednotili z metodo po Bradfordu. Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo na plošče s 96 vdolbinicami najprej odpipetirali po 40 µL reagenta Bradford, nato pa smo k reagentu dodali 160 µL razredčine BSA (0–100 µg/ml) in izmerili absorbanco pri 595 nm. Celične lizate smo redčili v razmerju 1:200–1:500 ter 160 µL redčenega lizata dodali k 40 µL reagenta Bradford. Glede na izmerjeno absorbanco smo določili koncentracijo proteinov v lizatu iz umeritvene krivulje.

3.2.2.9 Merjenje encimske aktivnosti

Aktivnost kaspaz in katD smo merili s pomočjo primernih sintetičnih fluorigenih substratov. Ustrezen volumen vzorca (50 µg proteinov) smo odpipetirali v črno mikrotitrsko ploščo ter dodali ustrezno količino pufra do volumna 90 µl. Vzorce smo 10 min inkubirali pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo vzorcem dodali 10 µl primernega substrata v končni koncentraciji 10 µM in izmerili fluorescenco s fluorimetrom za mikrotitrsko ploščo (Tecan Infinite M1000 Pro). Sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon) je sorazmerna encimski aktivnosti.

V tabeli 2 so prikazani encimi, uporabljeni substrati in pufri ter vzbujevalna in emisijska valovna dolžina svetlobe za ustrezen substrat.

Tabela 2: Substrati in njihove značilnosti za določanje encimske aktivnosti.

ENCIM	PUFER	SUBSTRAT	λ_{ex}	λ_{em}
kaspaza 8	kaspazni pufer	Ac-IETD-AMC	370 nm	460 nm
kaspaza 3, 6, 7	kaspazni pufer	Ac-DEVD-AFC	400 nm	505 nm
katepsin D	acetatni pufer pH 3,5	Bz-RGFFP-4-MeO β NA	340 nm	425 nm

3.2.2.10 Rekombinantne kaspaze

Rekombinantne človeške kaspaze 3, 6 in 7 smo v skladu s standardnimi protokoli (Denault & Salvesen, 2003; Roschitzki-Voser in sod., 2012) eksprimirali v *E.coli* ekspresijskem sistemu, kaspaza 8 pa je bila kupljena pri komercialnem prodajalcu (Novus Biologicals, UK). Aktivnost kaspaz smo preverili z uporabo komercialnih substratov, kot je bilo opisano v poglavju 3.2.3.9, aktivno koncentracijo posamezne kaspaze pa smo določili s titracijo aktivnega mesta (Roschitzki-Voser in sod., 2012) s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK. Ekspresijo človeških kaspaz ter določanje njihove aktivne koncentracije je izvedel dr. Matej Vizovišek (B1, IJS, Slovenija).

3.2.2.10.1 Cepitev stefina B z rekombinantnimi kaspazami

Očiščene rekombinantne aktivne kaspaze 3, 6, 7 in 8 smo v kaspaznem pufru za rekombinantne kaspaze redčili do 0,5 μM končne aktivne koncentracije, pri čemer je bilo končno razmerje med kaspazo in stefinom B v reakciji enako 1:20. Stefin B smo v reakcijsko mešanico dodali naknadno v končni koncentraciji 10 μM . Reakcijske mešanice smo do 3 h inkubirali pri 37 °C pri obeh pogojih pH (7 in 6), in sicer smo analizirali alikvote v različnih časovnih intervalih od 0 do 3 ur, pri čemer smo reakcijo prekinili z dodatkom 5x Laemlijevega pufra ter 5 min vretju vzorčkov pri 98 °C. Vzorce smo nato analizirali s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti NaDS in preverili potencialne cepitve stefina B. Eksperimente cepitev stefina B z rekombinantnimi kaspazami je izvedel dr. Iztok Dolenc (B1, IJS, Slovenija).

3.2.2.11 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Za ločevanje proteinov iz celičnih lizatov smo uporabili poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) pod redukcijskimi pogoji (z dodanim DTT). Poliakrilamidni gel je sestavljen iz 4 % koncentracijskega gela in 12,5 % ali 15 % ločevalnega gela. Elektroforeza je potekala na aparaturi P8DS Penguin™ (Owl Separation Systems, ZDA). Pred nanosom na gel smo vzorce z nanašalnim pufrom 15 min segrevali pri 95 °C. Elektroforeza enega gela je potekala pri stalnem toku 30 mA/gel v elektroforeznem pufru. Za določanje velikosti proteinov smo pri vsaki elektroforezi na gel nanegli referenčne proteinske standarde.

3.2.2.12 Imunoprenos

Po končani gelski elektroforezi smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano z imunoprenosom, ki je potekal 120 min pri konstantnem toku 280 mA. Membrane smo po končanem prenosu sprali s pufrom TBST ter prosta mesta na membrani 1 h blokirali v blokirnem pufru pri sobni temperaturi. Blokadi je sledilo ponovno spiranje membrane s pufrom TBST ter prekonočna inkubacija membrane s primarnimi protitelesi, redčenimi v blokirnem pufru pri 4 °C. Nevezana protitelesa smo 3-krat po 15 min sprali s pufrom TBST, čemur je sledila 45 min inkubacija membrane v raztopini sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo v blokirnem pufru pri sobni temperaturi. Nevezana sekundarna protitelesa smo 3-krat po 15 min sprali s pufrom TBST. Za detekcijo proteinov smo uporabili sistem ECL po navodilih proizvajalca. Nivo β -aktina ali GAPDH je služil za kontrolo enakega nanosa vzorcev.

Poglavje 4

Rezultati

4.1 Ovrednotenje celičnih modelov za sproženje apoptoze s TNF α in menadionom

Ovrednotenje vloge katD v celični smrti, sproženi s TNF α in menadionom, smo pričeli s preliminarnimi poskusi, ki so vodili v izbiro najprimernejše celične linije za nadaljnje poskuse. Izbrali smo 6 izvorno različnih celičnih linij ter jih testirali na občutljivost za sprožitev apoptoze. TNF α smo uporabili v kombinaciji s cikloheksimidom (CHX), ki z inhibicijo proteinske sinteze povzroči, da je aktivacija NF- κ B zavrnjena in v celicah ob dodatku TNF α poteče apoptoza (Pajak in sod., 2005). Rezultati so prikazani v tabeli 3. Ugotovili smo, da sta za preučevanje apoptoze primerni celični liniji U937 ter THP-1. Celična linija U937 se je izkazala za najbolj primerno ob upoštevanju kriterija o primerni ekspresiji katD na RNK in proteinskem nivoju (Ponten in sod., 2011), zato je bila izbrana za nadaljnje poskuse.

Tabela 3: Odziv različnih celičnih linij na TNF α (10–20 ng/ml)/CHX(1 μ /ml) ali menadion (20–50 μ M) v trajanju 12 h.

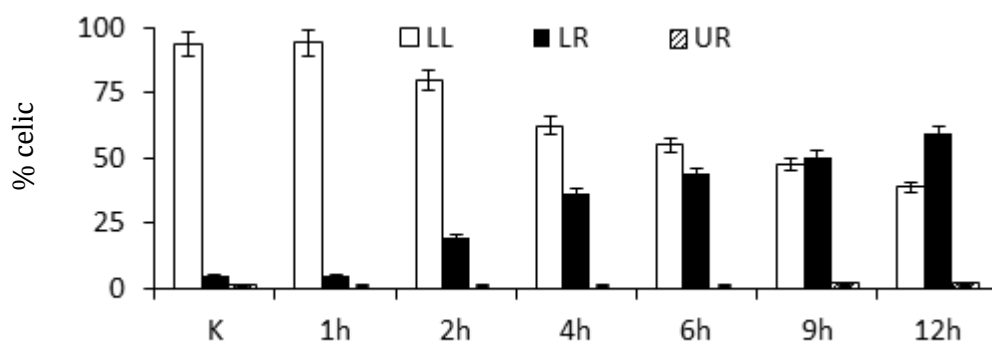
CELIČNA LINIJA	ODZIV NA TNF α /CHX	ODZIV NA MENADION
U937	apoptoza	apoptoza
makrofagi (diferencirani U937)	apoptoza	nekroza
THP-1	apoptoza	apoptoza
L929	nekroza	nekroptaza
SH-SY5Y	nekroza	nekroza
U87	neodzivne	nekroza

4.2 Sprožitev apoptoze s citokinom TNF α v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)

Pokazano je bilo, da lahko vnetni odziv sesalskih celic, ki ga povzroči TNF α , nadomestimo s sproženjem apoptoze ob dodatku cikloheksimida, ki inhibira sintezo proteinov. Celice U937 so, tako kot mnoge druge, odporne na citotoksične učinke TNF, vendar le-ti vodijo v apoptozo ob inhibiciji proteinske sinteze s strani CHX-a (Cossarizza in sod., 1995; Khwaja & Tatton, 1999).

4.2.1 Citokin $\text{TNF}\alpha$ sproži s časom inkubacije pogojeno apoptozo v človeški celični liniji U937

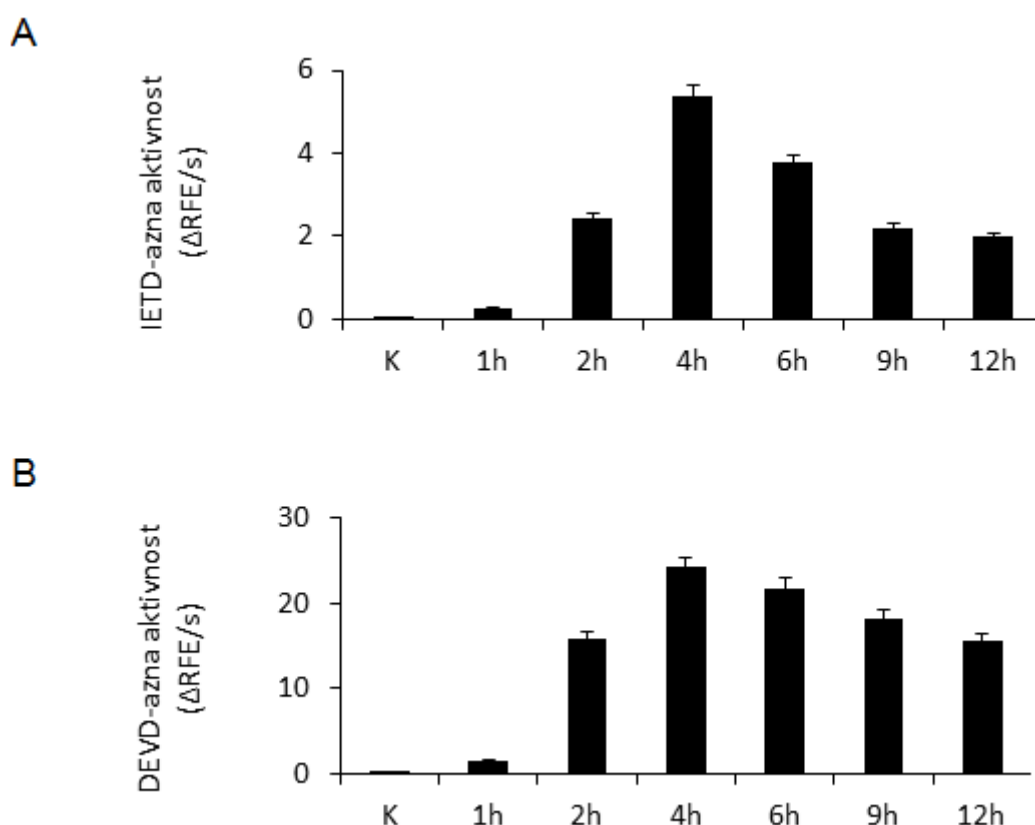
Celice smo tretirali s $\text{TNF}\alpha$ v koncentraciji 10ng/ml ob prisotnosti CHX-a v koncentraciji 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v časovnem okviru od 1 do 12 ur. Po koncu inkubacije smo na pretočnem citometru izvedli meritve celične integritete s pomočjo barvil Annexin V ter PI. Ugotovili smo, da je apoptoza, sprožena s TNF , pogojena s časom inkubacije ter da so zgodnje apoptotske celice prisotne že po 2 urah po začetku tretiranja (20 %), njihov delež pa je postopoma naraščal in po 12 urah dosegel 60 % (slika 14).



Slika 14: Odstotek živih (LL; Ann-/PI-), zgodnje apoptotskih (LR; Ann+/PI-) ter pozno apoptotskih celic (UR; Ann+/PI+) U937 po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. Označbe LL, LR in UR predstavljajo položaj celičnih populacij v citometričnih grafih (prikazano na sliki 17). K, kontrola.

4.2.2 Kaspazna aktivnost med apoptozo

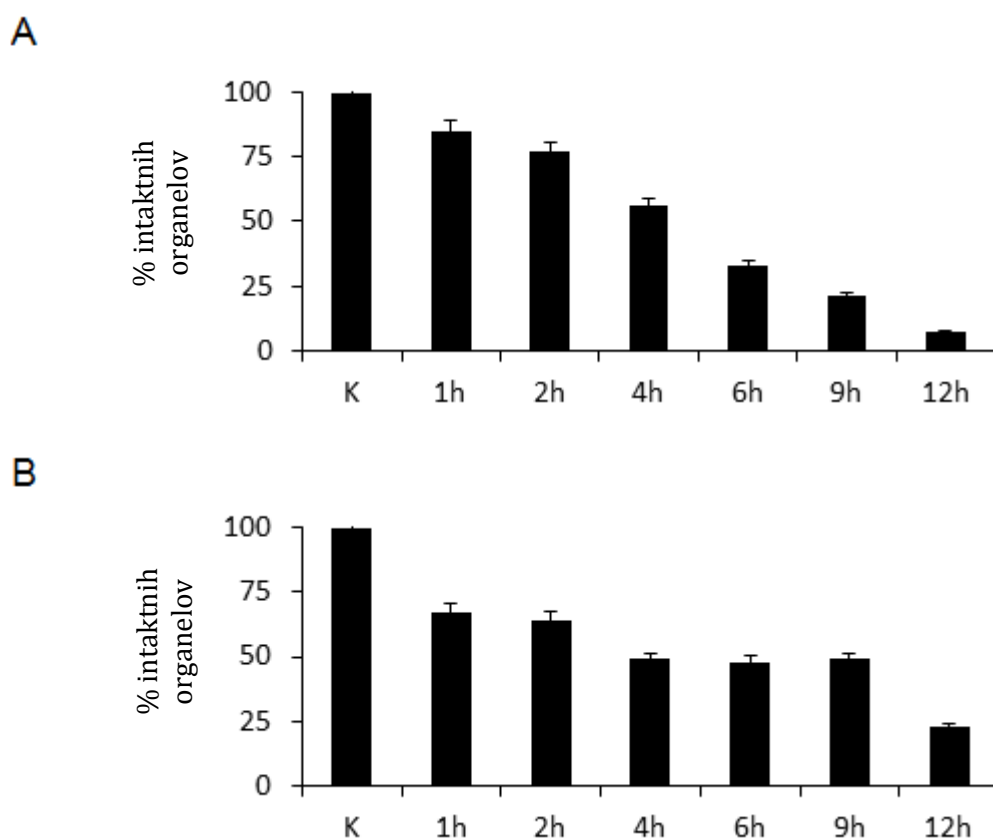
Kaspazno odvisnost apoptoze, sprožene s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$, smo preverili s pripravo celotnih celičnih lizatov v različnih časih od 1 do 12 ur in izmerili hidrolizo substratov Ac-IETD-AMC ter Ac-DEVD-AFC. V skladu s predhodnimi objavami smo kaspazno aktivnost zaznali relativno zgodaj med apoptozo, in sicer po 1 uri od začetka tretiranja, in opazili najvišjo aktivacijo po 4 urah. Pri obeh substratih smo zaznali podoben profil aktivacije kaspaz, čeprav smo opazili 5-kratno razliko v intenziteti signala med kaspazi 8 (slika 15A) in kaspazi 3 podobnimi (slika 15B) aktivnostmi.



Slika 15: (A) Hidroliza substrata Ac-IETD-AMC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. (B) Hidroliza substrata Ac-DEVD-AFC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. K, kontrola.

4.2.3 Poškodbe mitohondrijev in lizosomov med apoptozo

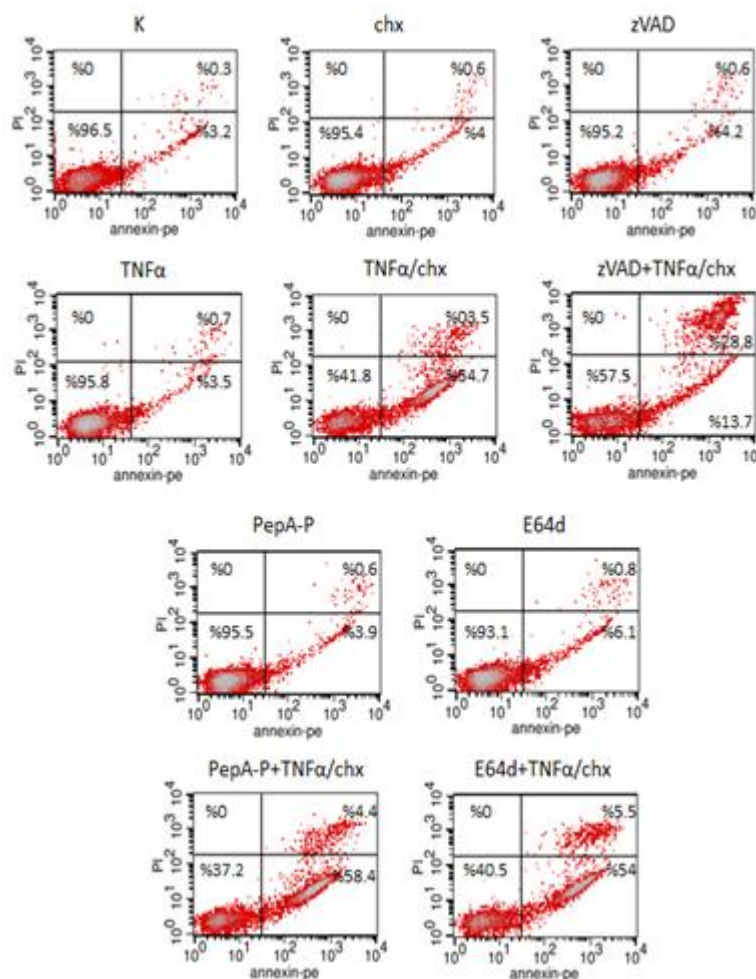
Na podlagi naših rezultatov o časovni odvisnosti apoptoze, sprožene s $\text{TNF}\alpha$ (slika 14), ter obstoječih objav o vpletenosti mitohondrijev in lizosomov v potek apoptoze (Guicciardi in sod., 2000; Gyrd-Hansen in sod., 2006; Heinrich in sod., 2004; Huai in sod., 2013; Werneburg in sod., 2004; Werneburg in sod., 2002) smo nato raziskali vpliv $\text{TNF}\alpha$ na integriteto teh organelov. Tako v primeru mitohondrijev kot lizosomov smo opazili prizadetost organelov po 1 uri od začetka tretiranja (slika 16). Po 4 urah se je integriteta membran mitohondrijev zmanjšala na 50 %, po 12 urah pa na 10 % (slika 16A). Podobno se je integriteta lizosomov zmanjšala na 50 % po 4 urah ter na 20 % po 12 urah (slika 16B), kar nakazuje na to, da so bili tako mitohondriji kot lizosomi poškodovani ter so prispevali k poteku apoptoze. Pokazano je bilo, da se ob poškodbi lizosomov citosolni pH U937 celic zniža s $7,2 \pm 0,1$ na $5,7 \pm 0,02$ v apoptotskih celicah (Nilsson in sod., 2006).



Slika 16: Integriteta mitohondrijev in lizosomov celic U937 po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. (A) Zmanjšanje fluorescence privzetega barvila Mitotracker Red CMX-Ros ob poškodbi mitohondrijske membrane. Graf prikazuje delež intactnih mitohondrijev v različnih časih po tretiranju. (B) Zmanjšanje fluorescence privzetega barvila akridin oranž ob poškodbi lizosomalne membrane. Graf prikazuje delež intactnih lizosomov v različnih časih po tretiranju. K, kontrola.

4.2.4 Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz na potek apoptoze

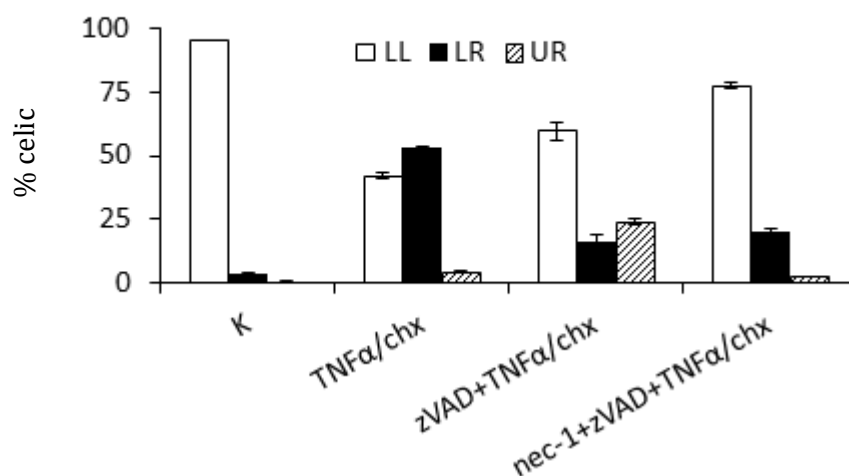
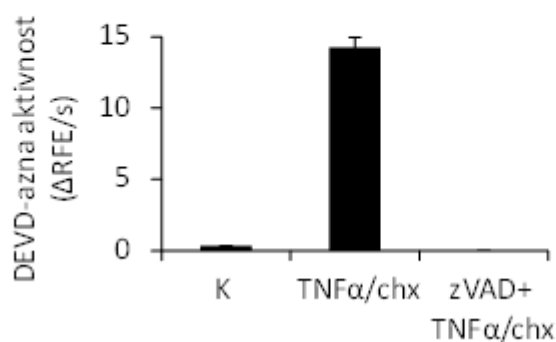
Ker smo pokazali, da tretiranje s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ prizadene celično, mitohondrijsko ter lizosomalno integriteto (slika 14, 16), smo preverili, če izbrani proteazni inhibitorji lahko preprečijo citotoksične učinke $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. Slika 17 prikazuje vpliv tretiranja v trajanju 12 ur na celično integriteto, ki smo jo spremljali z uporabo konjugata Annexin V-PE. Pokazali smo, da niti inhibitor aspartatnih proteaz PepA-P niti inhibitor cisteinskih proteaz E64d ne preprečita apoptoze. Inhibitor kaspaz, z-VAD-fmk je delno preprečil apoptozo, saj se je populacija apoptotskih celic zmanjšala za 20 %, pri čemer pa smo opazili porast pozno apoptotskih celic, kar nakazuje, da se ob dodatku z-VAD-fmk k $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ sproži nekroptoza (Sawai, 2013).



Slika 17: Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d in z-VAD-fmk na celično integriteto U937 po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. K, kontrola (netretirane celice). Slika prikazuje celične populacije v citometričnih grafih. Glede na postavljene meje, celice spadajo v eno izmed naslednjih populacij: žive celice (Ann-/PI-), zgodnje apoptotske celice (Ann+/PI-) ter pozno apoptotske celice (Ann+/PI+).

4.2.4.1 Potrditev nekroptoze ob predinkubaciji z inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk

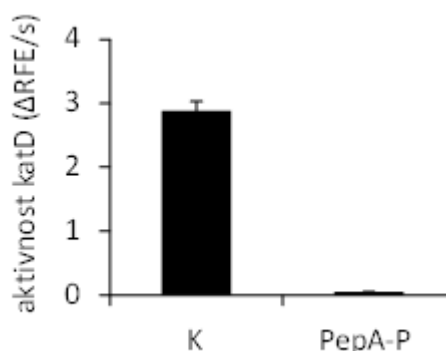
Želeli smo preveriti, ali gre pri U937 za sproženje nekroptoze, če celice inkubiramo z z-VAD-fmk ter $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. S pretočno citometrijo smo potrdili, da je inhibitor nekroptoze nekrostatin-1 preprečil pozne apoptotske dogodke (Annexin V+/PI+, UR), kar je povečalo delež nepoškodovanih celic (LL). Po drugi strani nekrostatin-1 ni preprečil zgodnjih apoptotskih dogodkov (Annexin V+/PI-, LR), ki jih je delno preprečil z-VAD-fmk (slika 18A). Dokončno smo potrdili, da gre za nekroptozo s popolno preprečitvijo DEVD-azne aktivnosti ob predinkubaciji U937 z z-VAD-fmk (slika 18B).

A**B**

Slika 18: Sproženje nekroptoze ob tretiranju U937 z z-VAD-fmk ter TNFα/CHX. (A) Odstotek živih (LL; Ann-/PI-), zgodnje apoptotskih (LR; Ann+/PI-) ter pozno apoptotskih celic (UR; Ann+/PI+). Označbe LL, LR in UR predstavljajo položaj celičnih populacij v citometričnih grafih (prikazano na sliki 17). (B) Hidroliza substrata Ac-DEVD-AFC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze s TNFα/CHX. K, kontrola.

4.2.4.2 Učinkovitost inhibicije katD s PepA-P

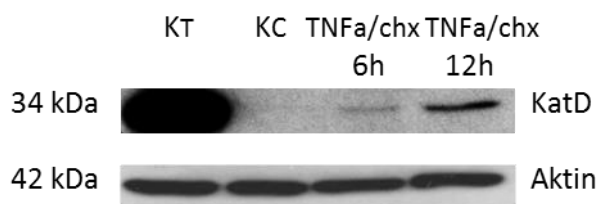
KatD smo inhibirali z biokonjugatom PepA-P, ker je bilo pokazano, da sta v primerjavi s pentapeptidom pepstatinom A celična permeabilnost ter aktivnost PepA-P mnogo boljši (Zaidi in sod., 2007). Pokazali smo, da je v U937 znotrajcelična aktivnost katD popolnoma preprečena ob predinkubaciji celic s PepA-P (slika 19).



Slika 19: Hidroliza substrata Bz-RGFFP-4-MeOβNA v celotnih celičnih lizatih U937. K, kontrola.

4.2.5 Detekcija katD v citosolu med apoptozo

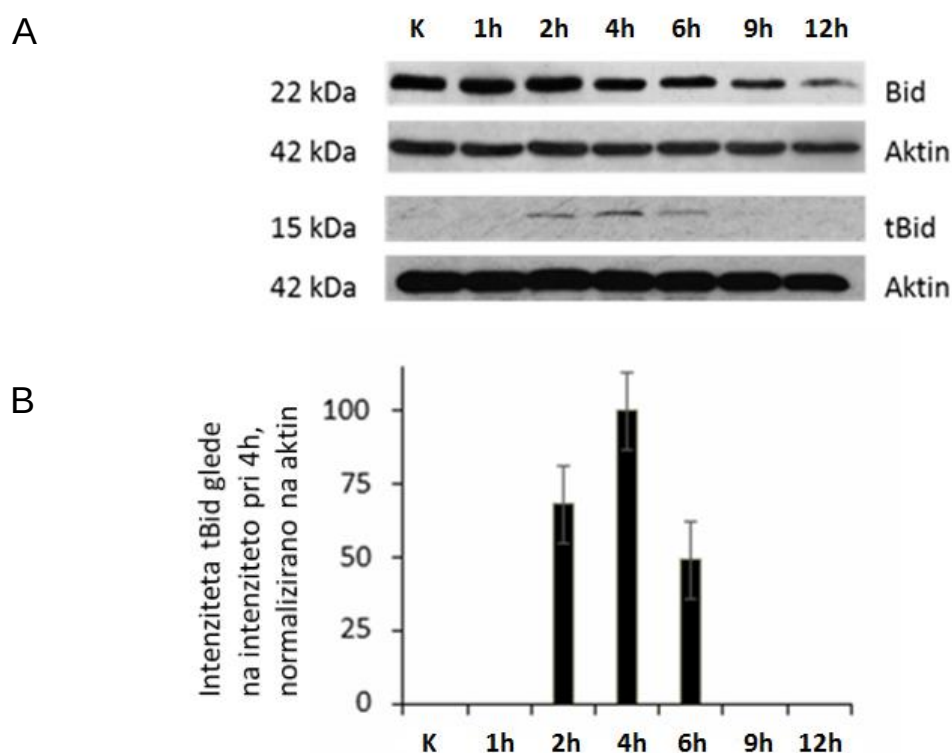
V skladu z rezultati o poškodovanosti lizosomov kot posledici sprožitve apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ (slika 16B) ter obstoječih objav, ki poročajo o aktivni vpletenosti katD v apoptozo, sproženo s $\text{TNF}\alpha$ (Heinrich in sod., 2004), smo nato pripravili citosolne lizate in potrdili, da se katD sprosti iz lizosomov v citosol po tretiranju s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ v celicah U937. S slike 20 je razviden 34 kDa velik fragment težke verige zrele proteaze po 6 urah, ki je postal močnejši po 12 urah od začetka tretiranja s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. V primerjavi z aktivacijo kaspaz, ki doseže vrhunec po 4h od začetka tretiranja, je sprostitvev katD v citosol pozen dogodek v apoptozi.



Slika 20: Imunodetekcija katepsina D med apoptozo, sproženo s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$, v celicah U937. KT, kontrola totalni lizat; KC, kontrola citosolni lizat.

4.2.6 Cepitev proteina Bid med apoptozo

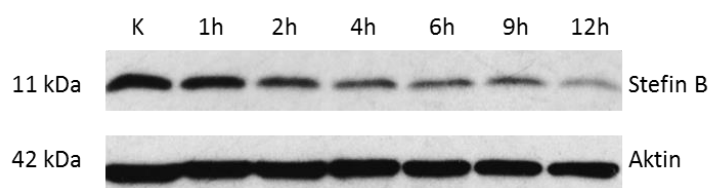
U937 so celice tipa II, za katere je značilno, da potrebujejo ojačitev apoptotskega signala preko mitohondrijske poti apoptoze s cepitvijo proapoptotskega proteina Bid, ki nato vodi v zadostno aktivacijo izvajalske kaspaze 3 (Ozoren & El-Deiry, 2002). Zato nas je zanimalo, kdaj pride do cepitve proteina Bid v našem celičnem modelu. Izsledke imunoprenosa smo izrazili tudi v obliki denzitometrične analize. Cepljeno obliko proteina Bid smo zaznali po 2 urah od začetka tretiranja s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ (68 %). Maksimalno cepitev smo zaznali po 4 urah, nato se je intenziteta cepitve zmanjšala na 49 % po 6 urah, kasneje pa cepitve nismo več zaznali, najverjetneje zaradi razgradnje fragmenta tBid (slika 21).



Slika 21: (A) Imunodetekcija celotne (Bid) in cepljene oblike (tBid) proteina Bid v celicah U937 po različnih časih inkubacije s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. K, kontrola. (B) Denzitometrični izračuni za tBid so bili narejeni v programu ImageJ, pri čemer so vrednosti intenzitete lis normalizirane glede na intenziteto lis aktina ter predstavljene kot odstotek intenzitete relativno glede na intenziteto lis pri štirih urah po začetku tretiranja s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$.

4.2.7 Razgradnja stefina B med apoptozo

Pokazano je bilo, da katD *in vitro* (Lenarčič in sod., 1988) in *ex vivo* (Železnik in sod., 2015) lahko razgradi stefin B, ki je tesno-vezavni kompetitivni citosolni inhibitor cisteinskih katepsinov (Turk in sod., 1994a). To dejstvo nas je skupaj z našimi rezultati o sprostitvi katD v citosol po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ spodbudilo k spremljanju morebitne razgradnje stefina B v našem celičnem modelu. Slika 22 prikazuje, da se stefin B postopno razgrajuje z naraščanjem časa inkubacije s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$, in sicer je razgradnja opazna po 4 urah od začetka tretiranja in najbolj opazna po 12 urah.

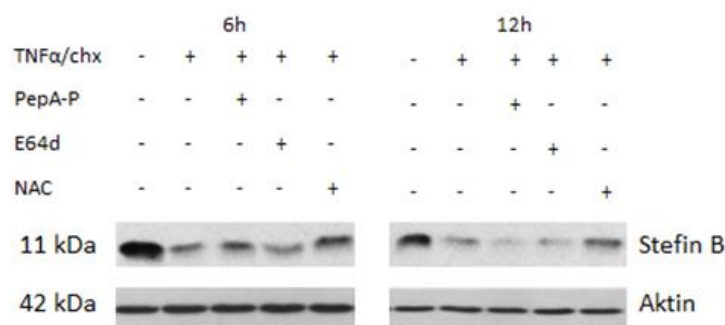


Slika 22: Imunodetekcija stefina B v celicah U937 po različnih časih inkubacije s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. K, kontrola.

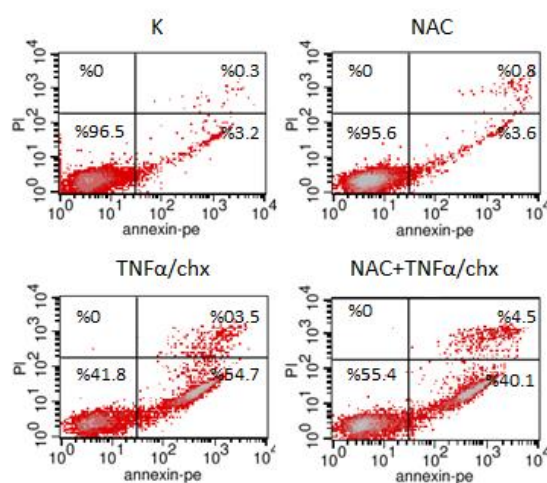
4.2.7.1 Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz ter NAC na razgradnjo stefina B ter vpliv NAC na potek apoptoze

V naslednjem koraku smo preverili, ali lahko razgradnjo stefina B preprečimo z inhibitorjema PepA-P ali E64d. Pripravili smo celotne celične lizate po 6 urah oz. 12 urah tretiranja s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. S slike 23A je razvidno, da niti katD niti cisteinski katepsini v U937 niso odgovorni za razgradnjo stefina B. Ker je bilo pokazano, da je količina stefina B v celicah obratno sorazmerno povezana z dovzetnostjo celic za oksidativni stres ter z njim povezano celično smrt (Butinar in sod., 2014), smo raziskali, ali lahko predinkubacija celic z NAC zaščiti celice pred citotoksičnimi učinki $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. S slike 23A lahko sklepamo, da NAC delno prepreči razgradnjo stefina B. Poleg tega je NAC delno preprečil tudi vpliv $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ na celično integriteto (slika 23B).

A



B



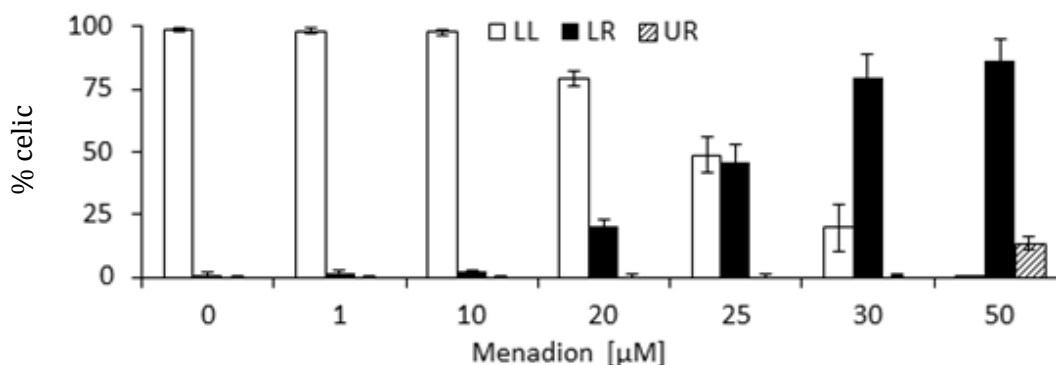
Slika 23: (A) Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d, z-VAD-fmk in antioksidanta NAC na razgradnjo stefina B po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX. Slika prikazuje imunodetekcijo stefina B po 6h in 12h tretiranja. (B) Vpliv NAC na celično integriteto U937 po sprožitvi apoptoze s TNF α /CHX. K, kontrola (netretirane celice). Slika prikazuje celične populacije v citometričnih grafih. Glede na postavljene meje, celice spadajo v eno izmed naslednjih populacij: žive celice (Ann-/PI-), zgodnje apoptotske celice (Ann+/PI-) ter pozno apoptotske celice (Ann+/PI+).

4.3 Sprožitev apoptoze z menadionom v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)

Menadion predstavlja izvor ROS in povzroča značilne oksidativne poškodbe v celicah (Baran in sod., 2010). Pokazano je bilo, da lahko sproži apoptozo v mišjih miogenih (celice C2C12) ter mišjih pankreatičnih acinarnih celicah (Baumgartner in sod., 2007; Chiou in sod., 2003). Po drugi strani pa je bila celična smrt v kokošjih kardiomiocitih neodvisna od apoptoze, vključevala pa je cepitev proteina PARP (Loor in sod., 2010). Celično smrt, sproženo z menadionom, smo preučili v izbranem celičnem modelu U937.

4.3.1 Menadion sproži koncentracijsko pogojeno apoptozo v človeški celični liniji U937

Celice smo 12 ur tretirali z različnimi koncentracijami menadiona. Po koncu inkubacije smo na pretočnem citometru izvedli meritve celične integritete s pomočjo barvil Annexin V ter PI (slika 24). Zgodnje apoptotske dogodke smo zaznali pri 20 μM koncentraciji menadiona (20 %), pri 25 μM koncentraciji je bilo teh dogodkov 45 %, pri 50 μM koncentraciji pa je bilo kar 85 % celic apoptotskih, pri čemer smo zaznali tudi pozne apoptotske dogodke (AnnexinV+/PI+). Glede na dobljene rezultate smo za preučevanje apoptoze, sprožene z menadionom, izbrali 25 μM koncentracijo menadiona ter 12-urni časovni interval.

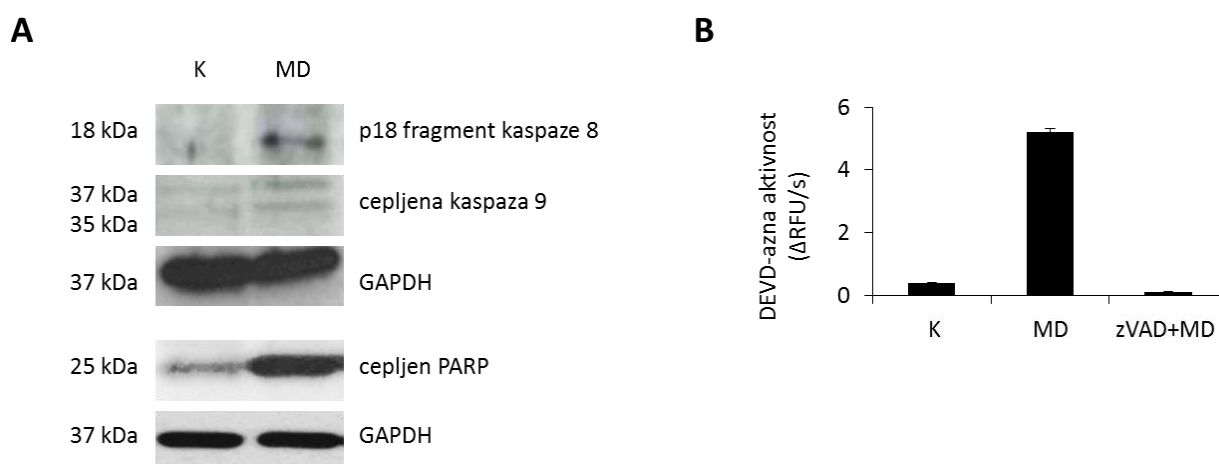


Slika 24: Odstotek živih (LL; Ann-/PI-), zgodnje apoptotskih (LR; Ann+/PI-) ter pozno apoptotskih celic (UR; Ann+/PI+) U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom. Označbe LL, LR in UR predstavljajo položaj celičnih populacij v citometričnih grafih (prikazano na sliki 17).

4.3.2 Aktivacija kaspaz in cepitev proteina PARP med apoptozo

Aktivnost sprožitvenih kaspaz 8 in 9 ter cepitev proteina PARP smo preverili s pripravo celotnih celičnih lizatov in imunodetekcijo cepljenih oblik po 12 h od začetka inkubacije z menadionom. Z izmerjeno hidrolizo substrata Ac-DEVD-AFC pa smo v celotnih celičnih lizatih po 12 urah inkubacije z menadionom ovrednotili kaspazi 3 podobno aktivnost.

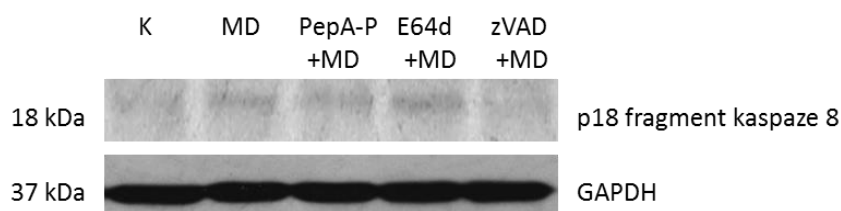
Ugotovili smo, da pride do aktivacije obeh sprožitvenih kaspaz, saj p18 fragment aktivne kaspaze 8 zaznamo le v tretiranem vzorcu, fragmenta aktivne kaspaze 9 (35 in 37 kDa) pa sta v tretiranem vzorcu občutno bolj izrazita kot v kontrolnem. Prav tako smo pokazali, da pride do cepitve proteina PARP, saj je 25 kDa fragment cepljenega proteina občutno bolj izrazit v tretiranem vzorcu (slika 25A). Slika 25B prikazuje DEVD-azno aktivnost izvršitvenih kaspaz (kaspazi 3 podobna aktivnost) in potrjuje njihovo aktivacijo.



Slika 25: (A) Imunodetekcija cepljenih oblik kaspaze 8 (p18), kaspaze 9 (35 in 37 kDa) ter proteina PARP (25 kDa) v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom. (B) Hidroliza substrata Ac-DEVD-AFC v celotnih celičnih lizatih U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom. K, kontrola.

4.3.2.1 Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz na aktivacijo kaspaze 8

Na podlagi rezultatov, da v našem celičnem modelu pride do aktivacije obeh sprožitvenih kaspaz 8 in 9, ter dejstva, da menadion kanonično sproži notranjo pot apoptoze preko mitohondrijev ter aktivacije kaspaze 9, nas je zanimalo, ali so morda za aktivacijo kaspaze 8 odgovorni katepsini, kot je bilo pokazano v mišjih pankreatičnih acinarnih celicah (Baumgartner in sod., 2007). Pripravili smo celotne celične lizate in izvedli imunodetekcijo cepljene oblike kaspaze 8 po 12 h od začetka inkubacije z menadionom. Ugotovili smo, da le predinkubacija celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK popolnoma prepreči aktivacijo kaspaze 8. Ob predinkubaciji celic s PepA-P ter E64d pa do aktivacije kaspaze vseeno pride (slika 26).

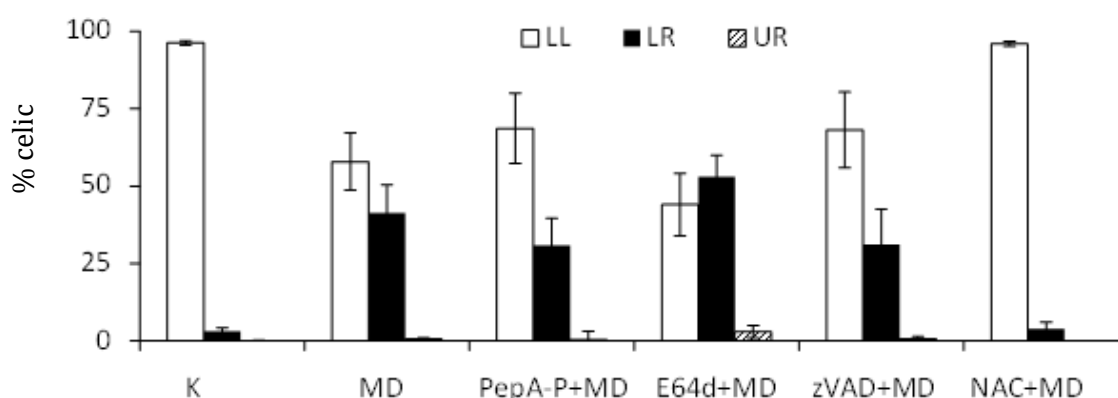


Slika 26: Imunodetekcija cepljene oblike kaspaze 8 (p18) ter vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-fmk na njeno cepitev v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom. K, kontrola.

4.3.3 Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz ter NAC na celično integriteto med apoptozo

Glede na predhodne objave, ki lizosomalnim Katepsinom izkazujejo pomembno vlogo pri apoptozi, sproženi z menadionom (Baumgartner in sod., 2007), smo preverili, ali lahko z inhibitorjem katD (PepA-P) cisteinskih Katepsinov (E64d) in splošnim kaspaznim inhibitorjem zVAD-FMK vplivamo na potek apoptoze. Ker je menadion znan celični oksidant, smo preverili tudi, kakšen vpliv na apoptozo ima NAC. Učinkovitost inhibicije katD s PepA-P je prikazana na sliki 19.

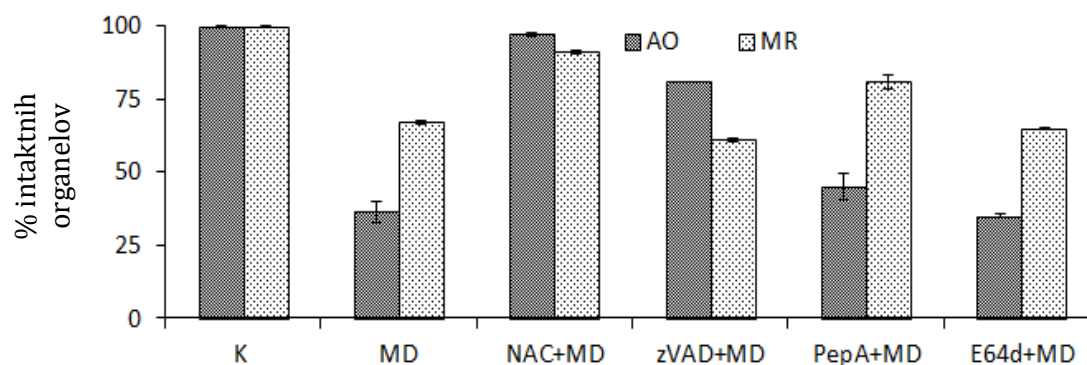
Ugotovili smo, da apoptoze ne moremo preprečiti z nobenim od izbranih inhibitorjev Katepsinov in kaspaz, po drugi strani pa smo apoptozo popolnoma prepečili s predinkubacijo celic z NAC (slika 27).



Slika 27: Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d, z-VAD-fmk ter NAC na celično integriteto U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom. K, kontrola (netretirane celice). Graf prikazuje odstotek živih (LL; Ann-/PI-), zgodnje apoptotskih (LR; Ann+/PI-) ter pozno apoptotskih celic (UR; Ann+/PI+). Označbe LL, LR in UR predstavljajo položaj celičnih populacij v citometričnih grafih (prikazano na sliki 17).

4.3.4 Vpliv izbranih inhibitorjev proteaz ter NAC na integriteto lizosomov ter mitohondrijev med apoptozo

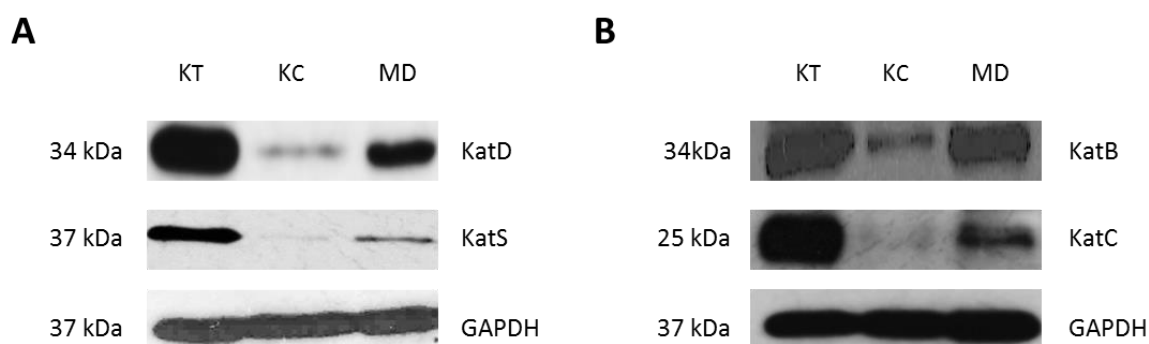
V naslednjem koraku smo preverili, ali lahko zaznamo učinke izbranih inhibitorjev katD (PepA-P), cisteinskih Katepsinov (E64d) ter kaspaz (z-VAD-FMK) na znotrajceličnem nivoju. Slika 28 prikazuje učinke predinkubacije celic z izbranimi inhibitorji ter NAC na integriteto lizosomov in mitohondrijev. Ugotovili smo, da so membrane tako lizosomov kot mitohondrijev poškodovane po 12 urah inkubacije s 25 μ M menadionom. Obsežnejše poškodbe smo zaznali pri lizosomih, in sicer se je integriteta membran lizosomov zmanjšala na 35 %, medtem ko se je integriteta mitohondrijev zmanjšala na 65 %. Predinkubacija celic s PepA-P ter E64d ni imela znatnejšega vpliva na integriteto preučevanih organelov. Opazili pa smo, da je predinkubacija celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem zVAD-FMK delno zaščitila lizosome pred citotoksičnimi vplivi menadiona, in sicer je integriteta lizosomalnih membran glede na kontrolo znašala 80 % ob predinkubaciji celic z z-VAD-FMK v primerjavi s 35 %, ko smo uporabili le stimulus. Po pričakovanjih je NAC popolnoma zaščitil integriteto lizosomalnih ter mitohondrijskih membran.



Slika 28: Vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d, z-VAD-fmk ter NAC na integriteto lizosomov (AO) ter mitohondrijev (MR) U937 po sprožitvi apoptoze z menadionom. Stolpci z oznako AO prikazujejo zmanjšanje fluorescence privzetega barvila akridin oranž ob poškodbi lizosomalne membrane. Stolpci z oznako MR prikazujejo zmanjšanje fluorescence privzetega barvila Mitotracker Red CMX-Ros ob poškodbi mitohondrijske membrane. K, kontrola (netretirane celice).

4.3.5 Detekcija katD in izbranih cisteinskih katepsinov v citosolu med apoptozo

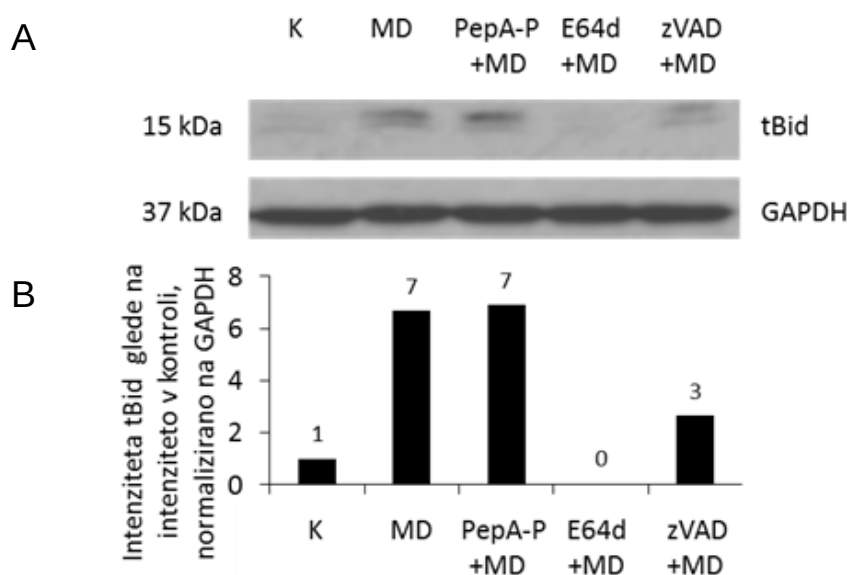
V skladu z rezultati o poškodovanosti lizosomov po sprožitvi apoptoze z menadionom (slika 28) ter obstoječih objav, ki poročajo o udeležbi lizosomalnih katepsinov v apoptozi, sproženi z le-tem (Baumgartner in sod., 2007), smo nato pripravili citosolne lizate in potrdili, da se tako katD kot tudi cisteinski katepsini B, C ter S sprostijo iz lizosomov v citosol po tretiranju z menadionom v celicah U937. S slike 29A je razviden 34 kDa velik fragment težke verige zrele proteaze katepsina D ter 37 kDa velik fragment zrele proteaze katepsina S po 12 urah, slika 29B pa ob istem času prikazuje zrela fragmenta katepsinov B ter C.



Slika 29: Imunodetekcija katepsinov B, D, C ter S med apoptozo, sproženo z menadionom v celicah U937. KT, kontrola totalni lizat; KC, kontrola citosolni lizat.

4.3.6 Cepitev proteina Bid med apoptozo in vloga izbranih inhibitorjev

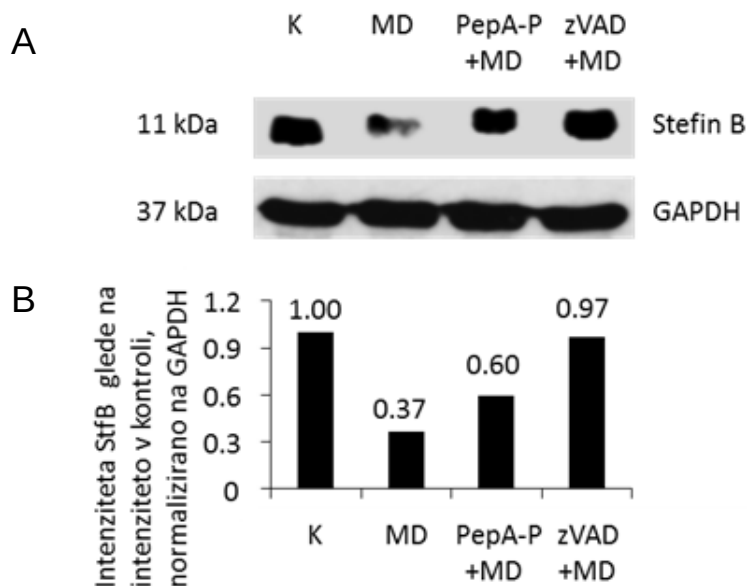
Celice U937, ki smo jih uporabili v poskusih, spadajo v skupino celic tipa II in potrebujejo ojačitev ekstrinzičnega apoptotskega signala preko notranje, mitohondrijske poti apoptoze s cepitvijo proteina Bid (Ozoren & El-Deiry, 2002). Menadion je izvor ROS in kanonično sproži intrinzično pot apoptoze. Ker pa smo ugotovili, da se ob sprožitvi apoptoze z menadionom aktivira kaspaza 8, smo preverili, ali pride tudi do cepitve proteina Bid in ali pri cepitvi sodelujejo katepsini. S slike 30 je razvidno, da je 15 kDa cepljena oblika proteina Bid po 12 h tretiranja z menadionom prisotna. Ugotovili smo tudi, da ob predinkubaciji celic z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E64d do cepitve Bida ne pride, le-ta pa je občutno zmanjšana ob predinkubaciji celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK. Po drugi strani predinkubacija celic z inhibitorjem katD PepA-P ni vplivala na cepitev Bida. Tako smo prvič pokazali, da so za cepitev Bida z menadionom tretiranih celic U937 odgovorni cisteinski katepsini.



Slika 30: (A) Imunodetekcija cepljene oblike (tBid) proteina Bid ter vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-fmk na njegovo cepitev v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom. K, kontrola. (B) Denzitometrični izračuni za tBid so bili narejeni v programu ImageJ, pri čemer so vrednosti intenzitete lis normalizirane glede na intenziteto lis GAPDH ter predstavljene kot odstotek intenzitete relativno glede na intenziteto lis pri kontroli.

4.3.7 Cepitev stefina B med apoptozo in vloga izbranih inhibitorjev

Kot je bilo omenjeno v poglavju razgradnje stefina B kot posledice delovanja TNF (4.2.7), lahko katD *in vitro* (Lenarčič in sod., 1988) in *ex vivo* (Železnik in sod., 2015) razgradi stefin B, tesno-vezavni kompetitivni citosolni inhibitor cisteinskih katepsinov (Turk in sod., 1994a). Ker smo tudi pri sprožitvi apoptoze z menadionom v citosolu detektirali katD, smo preverili, ali pride do cepitve stefina B tudi v primeru sprožitve apoptoze z menadionom. Na sliki 31 smo pokazali, da pride do cepitve stefina B (37 %) ob sprožitvi apoptoze z menadionom v celicah U937. Cepitev stefina B je popolnoma preprečil splošni kaspazni inhibitor z-VAD-FMK (97 %), delno pa tudi inhibitor katD PepA-P (60 %).



Slika 31: (A) Imunodetekcija stefina B ter vpliv inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-fmk na njegovo cepitev v celicah U937 po 12 h inkubacije z menadionom. K, kontrola. (B) Denzitometrični izračuni za stefin B so bili narejeni v programu ImageJ, pri čemer so vrednosti intenzitete lis normalizirane glede na inteziteto lis GAPDH ter predstavljene kot odstotek intenzitete relativno glede na inteziteto lis pri kontroli.

4.3.7.1 In vitro cepitve stefina B z rekombinantnimi kaspazami

In vitro smo preverili, ali kaspaze 3, 6, 7 in 8 lahko cepijo stefin B. Aktivne koncentracije kaspaz so znašale 20 μ M (kaspaza 3), 18 μ M (kaspaza 6), 50 μ M (kaspaza 7) ter 8 μ M (kaspaza 8). Najprej smo potencialne cepitve določali pri pH 7 in opazili, da do cepitev stefina B ne pride kljub dolgem inkubacijskemu času (do 3 h inkubacije) ter relativno visokemu razmerju med encimom in substratom (E:S=1:20). Nadalje smo ugotovili, da znižanje pH na 6 prav tako ni vplivalo na cepitve stefina B.

Kljub temu, da smo z analizami na celicah ugotovili, da predinkubacija celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK prepreči razgradnjo stefina B, smo z *in vitro* poskusi pokazali, da tudi pri visokih koncentracijah kaspaz izvršitvene kaspaze 3, 6 in 7 ter sprožitvena kaspaza 8 ne cepijo stefina B niti pri nevtralnih niti pri kislih pogojih. Cepitev stefina B je tako lahko posledica drugih posrednih, od kaspaz odvisnih proteolitičnih dogodkov.

Poglavje 5

Razprava

5.1 Sprožitev apoptoze s citokinom TNF α v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)

Lizosomalnim encimom so ob spoznanju o možnosti delne permeabilizacije lizosomalne membrane začeli pripisovati pomembnejše vloge v apoptozi (Guicciardi in sod., 2004). Do destabilizacije lizosomalne membrane in sproščanja katepsinov v citosol pride tudi ob sprožitvi zunanje poti apoptoze preko receptorjev smrti (Guicciardi in sod., 2000; Werneburg in sod., 2004; Werneburg in sod., 2002). Pokazano je bilo, da imajo cisteinski katepsini (Foghsgaard in sod., 2001; Guicciardi in sod., 2000; Gyrd-Hansen in sod., 2006; Werneburg in sod., 2002) in katD (Deiss in sod., 1996; Demoz in sod., 2002; Fritsch in sod., 2016; Heinrich in sod., 2004) pomembno vlogo v apoptozi, sproženi s citokinom TNF α . V nasprotju s tem so številne objave, ki dokazujejo, da katepsini niso ključni za sprožitev apoptoze s TNF α ter da proces kvečjemu le pospešujejo oz. ojačajo (Huai in sod., 2013; Klarić in sod., 2009) oziroma sploh niso omenjeni v TNF α sproženi apoptozi (Kroemer in sod., 2007). Poleg tega obstajajo nasprotujoči si rezultati glede vrstnega reda molekularnih dogodkov, ki sprožijo apoptotsko kaskado. Nekatere študije predlagajo, da je permeabilizacija lizosomalne membrane (LMP) zgođen dogodek v apoptozi, sproženi s TNF α (Guicciardi in sod., 2000; Heinrich in sod., 2004), medtem ko v drugih študijah predpostavijo, da je za LMP nujna predhodna aktivacija kaspaze 8 ter cepitev proapoptotskega proteina Bid (Werneburg in sod., 2004) ter da pride do permeabilizacije lizosomalne membrane (LMP) po permeabilizaciji zunanje mitohondrijske membrane (MOMP) (Huai in sod., 2013; Oberle in sod., 2010).

Z namenom raziskovanja vloge katD v zunanjo pot apoptoze, sprožene s TNF α /CHX, smo najprej izbrali najprimernejšo celično linijo za poskuse. Izmed 6 testiranih celičnih linij (U937, makrofagi, THP-1, L929, SH-SY5Y ter U87) se je za najprimernejšo izkazala celična linija človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937), ki je hkrati zadostila kriterijema o sproženju apoptotske celične smrti ter o primerni ekspresiji katD na RNK in proteinskem nivoju (Ponten in sod., 2011) (tabela 3).

Celice U937 so kot tudi mnoge druge rezistentne na citotoksične učinke TNF α (slika 17), učinkovito pa v njih lahko sprožimo apoptozo ob dodatku inhibitorja proteinske sinteze CHX (Cossarizza in sod., 1995; Khwaja & Tatton, 1999). CHX smo uporabili v končni koncentraciji 1 μ g/ml, ki ni bila toksična za celice in je sprožila apoptozo v kombinaciji s TNF- α (slika 17).

Naši rezultati so pokazali, da je apoptoza, sprožena s TNF α /CHX, časovno odvisna z naraščajočim deležem zgodnje apoptotskih celic, ki je pri 12 urah inkubacije dosegel 60 % (LR, slika 14). Pri merjenju IETD-azne (kaspazi 8 podobna aktivnost) in DEVD-azne (kaspazi 3 podobna aktivnost) aktivnosti smo opazili podoben aktivacijski profil tako sprožitvene (IETD) kot izvršitvenih kaspaz (DEVD), in sicer smo opazili porast v IETD-azni ter DEVD-azni aktivnosti že po 1 uri od začetka tretiranja, najvišjo aktivnost pa smo izmerili po 4 urah (slika 15).

Prizadetost membran mitohondrijev in lizosomov smo prav tako opazili že po 1 uri od začetka tretiranja, integriteta membran pa se je po 12 urah znižala na 10 % pri mitohondrijih ter 20 % pri lizosomih, kar kaže na to, da so bili tako mitohondriji kot lizosomi poškodovani kot posledica delovanja TNF α /CHX (slika 16).

Zgodaj v 12-urem časovnem intervalu, in sicer po 2 urah od začetka inkubacije, smo tudi zaznali cepljeno obliko proapoptotskega proteina Bid (tBid) (slika 21). Količina cepljenega

Bid-a je bila največja po 4 h od začetka tretiranja in se časovno ujema z najvišjo izmerjeno vrednostjo IETD-azne aktivnosti, kar nakazuje na to, da je Bid tarča sprožitvene kaspaze 8. To se ujema z dejstvom, da so U937 celice tipa II, ki potrebujejo ojačitev zunanjega apoptotskega signala preko mitohondrijev, da pride do zadostne aktivacije izvršitvene kaspaze 3 (Scaffidi in sod., 1998).

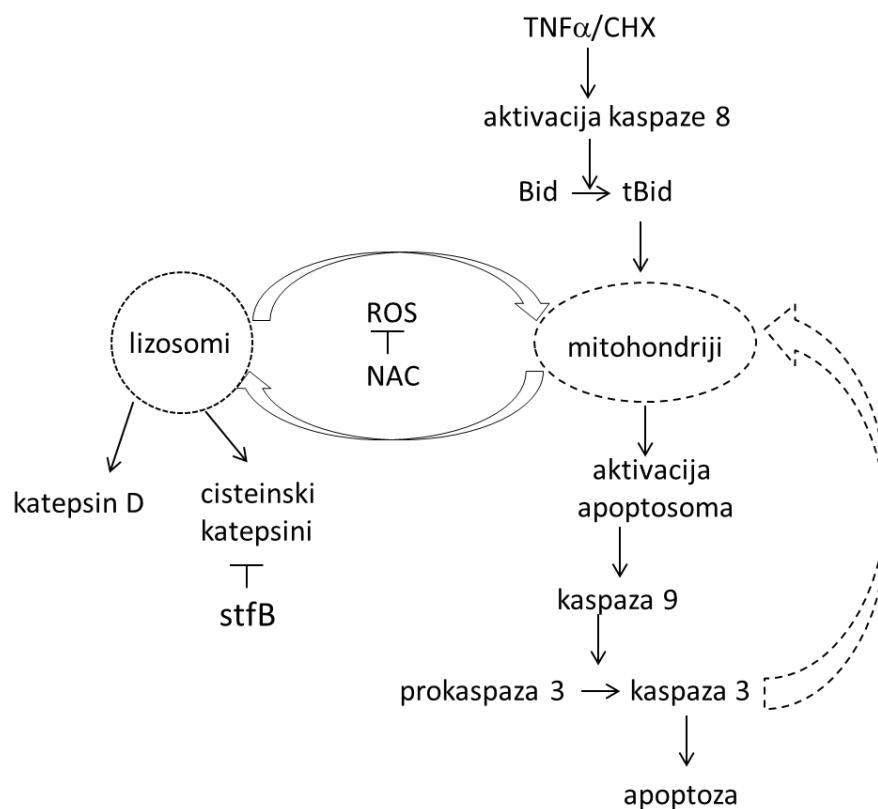
Pokazano je bilo, da se katD in tudi cisteinski katepsin B v različnih celičnih modelih sprostita v citosol ob različnih časih, in sicer so ju v citosolu zaznali od 1 ure pa do 8 ur po začetku tretiranja s $\text{TNF}\alpha$ (Foghsgaard in sod., 2001; Guicciardi in sod., 2000; Heinrich in sod., 2004). Naši rezultati so pokazali, da se katD sprosti v citosol po 6 urah (slika 20), kar pomeni, da je v našem celičnem modelu to pozen dogodek. V nasprotju s tem so rezultati, ki so katD umestili zgodaj v apoptotsko pot, sproženo s TNF , in sicer naj bi katD cepil Bid in s tem prispeval k ojačitvi apoptotskega signala celic tipa II preko sproščanja citokroma c iz mitohondrijev in posledični aktivaciji kaspaz 9 in 3 (Heinrich in sod., 2004). Nadalje smo pokazali, da katD tudi sicer nima ključne vloge pri apoptozi, sproženi s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$, saj predinkubacija celic z inhibitorjem katD, PepA-P, ni vplivala na potek apoptoze (slika 17). Za inhibicijo katD smo uporabili biokonjugat PepA-P, ker je bilo pokazano, da sta v primerjavi s pentapeptidom pepstatinom A celična permeabilnost ter aktivnost PepA-P mnogo boljši (Zaidi in sod., 2007). Pokazali smo, da je v U937 znotrajcelična aktivnost katD popolnoma preprečena ob predinkubaciji celic s PepA-P (slika 19).

Želeli smo preveriti, ali cisteinski katepsini vplivajo na potek apoptoze v našem celičnem modelu, zato smo uporabili inhibitor cisteinskih proteaz E64d, ki pa prav tako ni vplival na potek apoptoze (slika 17).

Splošni inhibitor kaspaz z-VAD-FMK je delno preprečil apoptozo, saj se je populacija apoptotskih celic zmanjšala za 20 %, pri čemer pa smo opazili porast pozno apoptotskih celic, kar nakazuje, da se ob dodatku z-VAD-FMK k $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ sproži nekroptoza (slika 17) (Sawai, 2013). Slednje smo tudi potrdili z uporabo inhibitorja apoptoze, nekrostatina-1. Iz slike 18A je razvidno, da je nekrostatin-1 preprečil pozne apoptotske dogodke (Annexin V+/PI+, UR), kar je povečalo delež nepoškodovanih celic (LL). Ni pa preprečil zgodnjih apoptotskih dogodkov (Annexin V+/PI-, LR), ki jih je delno preprečil z-VAD-fmk. Tako smo s popolno preprečitvijo DEVD-azne aktivnosti ob predinkubaciji U937 z z-VAD-fmk dokončno potrdili, da gre za nekroptoza (slika 18B).

Dejstvo, da smo v citosolu po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ detektirali katD ter obstoječim in vitro (Lenarčič in sod., 1988) ter ex vivo (Železnik in sod., 2015) dokazom, da katD lahko razgradi tesno-vezavni kompetitivni inhibitor cisteinskih katepsinov stefin B (Turk in sod., 1994a), nas je spodbudilo k spremljanju morebitne razgradnje stefina B v našem celičnem modelu. Na sliki 22 smo tako prvič predstavili, da je razgradnja stefina B postopna in napreduje z naraščanjem časa inkubacije s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. Razgradnjo smo opazili po 4 urah od začetka tretiranja, najbolj očitna pa je bila po 12 urah. Nadalje smo ugotovili, da razgradnje stefina B ne moremo preprečiti niti s PepA-P, kot je bilo pokazano v podganji tiroidni celični liniji FRTL-5 (Železnik in sod., 2015), niti z E64d. Pokazano pa je bilo, da je količina stefina B v citosolu celic obratno sorazmerno povezana z dovzetnostjo celic za oksidativen stres ter z njim povezano celično smrt (Butinar in sod., 2014). Zato smo preverili, ali lahko predinkubacija celic z antioksidantom NAC zaščiti celice pred citotoksičnimi učinki $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$. Iz slike 23A je razvidno, da NAC delno prepreči razgradnjo stefina B, kar se odraža tudi pri delni zaščiti celične integritete (slika 23B).

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko predpostavimo naš model sprožitve apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ (slika 32). V celicah se najprej aktivira kaspaza 8, cepi se protein Bid in pride do MOMP, ki ji sledi aktivacija apoptosoma ter kaspaze 3. Nastanek in sproščanje ROS iz mitohondrijev vodi v LMP, ki v kaskadi predstavlja pozen dogodek, ki sledi MOMP, ne gre pa za ojačevalno zanko, kot je bilo nedavno predlagano (Huai in sod., 2013), saj inhibicija katD in cisteinskih katepsinov nikakor ne vpliva na potek apoptoze. LMP povzroči sproščanje katD v citosol, ki je kot rečeno pozen apoptotski dogodek. Naši rezultati tako potrjujejo trditev, da LMP in sproščeni katepsini niso potrebni za sprožitev apoptoze. Ugotovili smo, da ob tretiranju celic U937 s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ pride do razgradnje stefina B, kar kar smo delno preprečili s predinkubacijo celic z NAC.



Slika 32: Mehanističen vpogled na apoptozo, sproženo s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ v celicah U937. $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ sproži aktivacijo kaspaze 8 in posledično cepitev proapoptotskega proteina Bid v tBid, ki se translocira v mitohondrije in sproži notranjo pot apoptoze (aktivacija apoptosoma, kaspaze 9 in izvršitvenih kaspaz). Permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane vodi v sprostitvev nastalih ROS v citosol, kjer povzročijo permeabilizacijo lizosomalne membrane in sprostitvev katepsinov (katepsin D, cisteinski katepsini) v citosol. Stefin B, endogeni inhibitor cisteinskih katepsinov, se kot posledica delovanja $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ v citosolu razgradi.

5.2 Sprožitev apoptoze z menadionom v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937)

V drugem delu smo raziskali morebitno vlogo katD v notranji poti apoptoze. Kljub dejstvu, da imajo kaspaze vodilno vlogo v apoptozi, so novejšje študije namreč pokazale, da so ob zmernih poškodbah lizosomalnih membran v signalizacijo apoptoze udeleženi tudi katepsini (Guicciardi in sod., 2004). Notranjo pot apoptoze sprožijo različne poškodbe v celici, tudi tiste, ki so posledice oksidativnega stresa (Green & Kroemer, 2004).

ROS, ki sicer veljajo za toksične stranske produkte celičnega metabolizma, lahko delujejo kot signalne molekule in uravnavajo številne fiziološke procese (Sena & Chandel, 2012). ROS so pomembni sprožilci zunanje poti apoptoze preko celičnih receptorjev kot tudi notranje, mitohondrijske poti apoptoze (Sinha in sod., 2013). Dober primer izvora ROS predstavlja menadion (2-methyl-1,4-naphtoquinone, vitamin K3), ki povzroči značilne oksidativne poškodbe, med drugim poškodbe makromolekul, porušenje kalcijeve homeostaze, izčrpanje celičnih tiolnih zalog, peroksidacijo lipidov, destabilizacijo lizosomov ter končno celično smrt (Baran in sod., 2010). Pokazano je bilo, da je celična smrt, sprožena z menadionom, odvisna od njegove koncentracije in ko je ta primerna, poteče apoptoza (Chiou in sod., 2003). Menadion je tako sprožil apoptozo v mišjih miogenih (celice C2C12) ter mišjih pankreatičnih acinarnih celicah (Baumgartner in sod., 2007; Chiou in sod., 2003), medtem ko je bila celična smrt v kokošjih kardiomiocitah neodvisna od apoptoze, vključevala pa je cepitev proteina PARP (Loor in sod., 2010).

Celično smrt, sproženo z menadionom s poudarkom na morebitni vlogi katD v procesu, smo preučili v celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937). Kot smo že prikazali v poglavju 5.1, smo se za ta celični model odločili na podlagi primernega odziva celic (apoptoze) na menadion ter ustrezne ekspresije katD na RNK in proteinskem nivoju (Ponten in sod., 2011) (tabela 3).

Najprej smo na celicah U937 naredili optimizacijo z različnimi koncentracijami menadiona. Zgodnje apoptotske dogodke smo zaznali pri 20 μ M koncentraciji (20 %), pri 25 μ M koncentraciji je bilo teh dogodkov 45 %, pri 50 μ M koncentraciji pa je bilo kar 85 % celic apoptotskih, pri čemer smo zaznali tudi pozne apoptotske dogodke (AnnexinV+/PI+) (slika 24). Glede na dobljene rezultate smo za preučevanje apoptoze, sprožene z menadionom, izbrali 25 μ M koncentracijo menadiona ter 12-urni časovni interval.

Pokazano je bilo, da se vpliv menadiona razlikuje glede na uporabljen celični model. Različni podatki o aktivaciji sprožitvenih kaspaz 8 in 9, izvršitvene kaspaze 3 ter cepitvi proteina PARP (Baumgartner in sod., 2007; Chiou in sod., 2003; Gerasimenko in sod., 2002; Loor in sod., 2010) so nas spodbudili, da smo raziskali vpliv menadiona na omenjene tarče v našem celičnem modelu.

Ugotovili smo, da se aktivirata obe sprožitveni kaspazi 8 in 9 (slika 25A). Naši rezultati se ujemajo z izsledki Baumgartnerja in sod., ki so pokazali, da pride ob tretiranju mišjih pankreatičnih acinarnih celic z menadionom do aktivacije kaspaze 8 in kaspaze 9 (Baumgartner in sod., 2007).

Nadalje smo potrdili, da pride v celicah U937 ob dodatku menadiona do cepitve proteina PARP (slika 25A). Slednji je član družine proteinov (PARP), ki sodelujejo pri različnih celičnih procesih, kot so popravilo DNK, genomska stabilnost in programirana celična smrt (Herceg & Wang, 2001). Pokazano je bilo, da oksidativne poškodbe DNK lahko aktivirajo PARP, njegova aktivacija pa je povezana s poškodbami mitohondrijev, sprostitvijo citokroma c v citosol in celično smrtjo kot posledico izčrpanja celičnih ATP zalog (Yu in sod., 2002). PARP se inaktivira s cepitvijo, ki jo izvrši kaspaza 3 (Boulares in sod., 1999), ko so poškodbe DNK preobsežne. V takih primerih je s sproženjem apoptoze energija prihranjena za neprizadete celice (Berger, 1985). Naši rezultati so v skladu z ugotovitvami Loorja in sod., ki so pri kokošjih kardiomiocitah pokazali, da je cepitev proteina PARP bistvenega pomena za celično smrt, sproženo z menadionom, saj se je celična smrt signifikantno znižala v celicah z izbitim genom za PARP-1. Po drugi strani v omenjeni publikaciji zatrjujejo, da ne gre za apoptotsko celično smrt, pri čemer so sledili le kanonični poti sprožitve apoptoze z menadionom in niso upoštevali morebitne aktivacije kaspaze 8 (Loor in sod., 2010).

Slika 25B prikazuje aktivacijo izvršitvenih kaspaz (DEVD-azna aktivnost), ki je bila tako potrjena v našem celičnem modelu. Naši rezultati se ujemajo z izsledki na mišjih miogenih

celicah C2C12 (Chiou in sod., 2003) ter mišjih pankreatičnih acinarnih celicah (Gerasimenko in sod., 2002).

Zanimalo nas je, ali so za aktivacijo kaspaze 8 odgovorni katepsini, kot je bilo pokazano v mišjih pankreatičnih acinarnih celicah (Baumgartner in sod., 2007). Ugotovili smo, da le predinkubacija celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK popolnoma prepreči aktivacijo kaspaze 8, ob predinkubaciji celic z PepA-P ter E64d pa do aktivacije kaspaze vseeno pride (slika 26). To pomeni, da v našem celičnem modelu kaspaza 8 verjetno ni neposredna tarča katepsinov.

Na podlagi objav, ki lizosomalnim katepsinom pripisujejo pomembno vlogo pri apoptozi, sproženi z menadionom (Baumgartner in sod., 2007), smo preverili, ali lahko z inhibitorjem katD (PepA-P) cisteinskih katepsinov (E64d) ali pa splošnim kaspaznim inhibitorjem zVAD-FMK vplivamo na potek apoptoze. Ker je menadion znan celični oksidant, smo preverili tudi, kakšen vpliv na apoptozo ima NAC. KatD smo učinkovito inhibirali s PepA-P, kar je prikazano na sliki 19. Ugotovili smo, da apoptoze ne moremo preprečiti z nobenim od izbranih inhibitorjev katepsinov in kaspaz, po drugi strani pa smo apoptozo popolnoma preprečili s predinkubacijo celic z NAC (slika 27). Dobljeni rezultati se ujemajo z rezultati Looija in sod., ki so zaključili, da menadion sproži celično smrt preko mehanizmov, povezanih z ROS, pri čemer pride do aktivacije več redundantnih signalnih poti, njihov mediator pa je PARP (Loo in sod., 2010).

V nadaljnjem koraku smo želeli preveriti, ali lahko zaznamo učinke izbranih inhibitorjev PepA-P, E64d ter z-VAD-FMK na znotrajceličnem nivoju. S slike 28 je razvidno, da so membrane lizosomov in mitohondrijev poškodovane po 12 urah inkubacije s 25 μ M menadionom. Naši rezultati se ujemajo z izsledki Baumgartnerja in sod., ki pokažejo, da menadion vpliva na obe vrsti organelov (Baumgartner in sod., 2007). Obsežnejše poškodbe smo zaznali pri lizosomih, njihova integriteta se je zmanjšala na 35 %, medtem ko se je integriteta mitohondrijev zmanjšala na 65 %. Predinkubacija celic z inhibitorjem PepA-P ter E64d ni imela znatnejšega vpliva na integriteto preučevanih organelov. Opazili pa smo, da je predinkubacija celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem zVAD-FMK delno zaščitila lizosome pred citotoksičnimi vplivi menadiona, in sicer je integriteta lizosomalnih membran glede na kontrolo znašala 80 % ob predinkubaciji celic z z-VAD-FMK v primerjavi s 35 %, ko smo uporabili le stimulus. Po pričakovanjih je NAC popolnoma zaščitil integriteto lizosomalnih ter mitohondrijskih membran.

Ker smo pokazali, da menadion povzroči poškodbe lizosomov (slika 28), in ker naj bi lizosomalni katepsini sodelovali v apoptozi, sproženi z menadionom (Baumgartner in sod., 2007), smo preverili, ali pride do sprostitve katepsinov v citosol v našem celičnem modelu. V citosolu smo potrdili prisotnost tako katD kot tudi cisteinskih katepsinov B, C ter S (slika 29).

Kot je bilo že omenjeno, menadion kanonično sproži intrinzično pot apoptoze preko mitohondrijev. Ker pa smo ugotovili, da se ob sprožitvi apoptoze z menadionom aktivira kaspaza 8, smo preverili, ali pride tudi do cepitve proteina Bid ter ali pri cepitvi sodelujejo katepsini. Ugotovili smo, da se Bid pri uporabljenih pogojih v celicah U937 cepi. Nadalje smo pokazali, da so za cepitev Bida odgovorni cisteinski katepsini in ne katD, saj ob predinkubaciji celic z inhibitorjem cisteinskih katepsinov E64d do cepitve Bida ne pride, predinkubacija celic z inhibitorjem katD PepA-P pa ni vplivala na cepitev Bida. Cepitev Bida se je prav tako občutno zmanjšala ob predinkubaciji celic s splošnim kaspaznim inhibitorjem z-VAD-FMK, kar kaže na to, da je Bid tudi tarča kaspaz, najverjetneje kaspaze 8, kot je bilo že pokazano sicer z uporabo drugih apoptotskih stimulusov (slika 30) (Chen in sod., 2001; Cirman in sod., 2004; Li in sod., 1998; Luo in sod., 1998; Mandić in sod., 2002; Stoka in sod., 2001). Tako smo prvič pokazali, da so za cepitev Bida z menadionom tretiranih celic U937 odgovorni cisteinski katepsini. Kljub pokazanemu, sama cepitev Bida ne vpliva na potek apoptoze, saj je nismo preprečili z nobenim od izbranih inhibitorjev katepsinov in kaspaz.

Pri apoptozi, sproženi s TNF α /CHX, smo prvič pokazali, da pride med apoptozo do razgradnje endogenega inhibitorja cisteinskih katepsinov, stefina B. Zanimalo nas je, ali se stefin B cepi tudi med apoptozo, sproženo z menadionom. Na sliki 31 smo tako prvič pokazali, da pride do cepitve stefina B (37 %) ob sprožitvi apoptoze z menadionom v celicah U937. Cepitev stefina B je popolnoma preprečil splošni kaspazni inhibitor z-VAD-FMK (97 %), delno pa tudi inhibitor katD PepA-P (60 %).

Želeli smo ugotoviti, katere kaspaze so odgovorne za cepitev stefina B, zato smo izvedli serijo in vitro poskusov z rekombinantnimi kaspazami 3, 6, 7 in 8. Ugotovili smo, da tudi pri uporabljenih visokih koncentracijah kaspaz izvršitvene kaspaze 3, 6 in 7 ter sprožitvena

Poglavje 6

Zaključki

Na celicah človeškega levkemijskega monocitnega limfoma (U937) smo po sprožitvi apoptoze s $\text{TNF-}\alpha/\text{CHX}$ z uporabo inhibitorjev proteaz ovrgli ključno vlogo katD in cisteinskih katepsinov pri sprožitvi apoptoze po tej poti. Čeprav pride do poškodb lizosomov in izpusta katepsinov v citosol, inhibicija katD in cisteinskih katepsinov ne vpliva na potek apoptoze. Nastanek in sproščanje ROS iz mitohondrijev vodi v LMP, ki je pozen dogodek v apoptozi in nastopi za MOMP. Prvič smo pokazali, da pride v celicah U937 do postopne razgradnje endogenega inhibitorja cisteinskih katepsinov, stefina B, ki napreduje z naraščanjem časa inkubacije s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$.

Doktorska disertacija prinaša nova spoznanja tudi o molekularnih mehanizmih sprožitve apoptoze preko indukcije oksidativnega stresa. Prvič smo pokazali, da pride v celicah U937 ob sprožitvi apoptoze z menadionom do cepitve proapoptotskega proteina Bid ter da so za cepitev odgovorni cisteinski katepsini. Pokazali smo tudi, da cepitev ni ključna za potek apoptoze ampak predstavlja pozen apoptotski dogodek. Nadalje smo pokazali, da se aktivirata obe sprožitveni kaspazi 8 in 9, pride pa tudi do cepitve proteina PARP. Z uporabo inhibitorjev proteaz smo tudi v primeru apoptoze, sprožene z menadionom, ovrgli ključno vlogo katD in cisteinskih katepsinov pri tem procesu. Ugotovili pa smo, da prav tako kot v primeru sprožitve apoptoze s $\text{TNF}\alpha/\text{CHX}$ pride do cepitve stefina B tudi v apoptozi, sproženi z menadionom, kar smo preprečili s predinkubacijo celic z z-VAD-FMK ter delno s PepA-P.

Literatura

- Abrahamson, M., Barrett, A. J., Salvesen, G., & Grubb, A. (1986). Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *The Journal of biological chemistry*, 261(24), 11282-11289.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., & Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2), 423-432.
- Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
- Aits S. & Jaattela M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of cell science*, 126: 1905-1912.
- Alenzi, F. Q., Lotfy, M., & Wyse, R. (2010). Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 11(2), 271-280.
- Appelqvist, H., Johansson, A. C., Linderöth, E., Johansson, U., Antonsson, B., Steinfeld, R., Kagedal, K., & Ollinger, K. (2012). Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Annals of clinical and laboratory science*, 42(3), 231-242.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.
- Baran, I., Ganea, C., Scordino, A., Musumeci, F., Barresi, V., Tudisco, S., Privitera, S., Grasso, R., Condorelli, D. F., Ursu, I., Baran, V., Katona, E., Mocanu, M. M., Gulino, M., Ungureanu, R., Surcel, M., & Ursaciuc, C. (2010). Effects of menadione, hydrogen peroxide, and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell biochemistry and biophysics*, 58(3), 169-179.
- Baranski, T. J., Koelsch, G., Hartsuck, J. A., & Kornfeld, S. (1991). Mapping and molecular modeling of a recognition domain for lysosomal enzyme targeting. *The Journal of biological chemistry*, 266(34), 23365-23372.
- Barrett, A. J. (1979). Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. *Ciba Foundation symposium*(75), 37-50.
- Barrett, A. J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Jarvinen, M., Katunuma, N., Machleidt, W., Müller-Esterl, W., Sasaki, M., & Turk, V. (1986). Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *The Biochemical journal*, 236(1), 312.
- Baskin-Bey, E. S., Canbay, A., Bronk, S. F., Werneburg, N., Guicciardi, M. E., Nyberg, S. L., & Gores, G. J. (2005). Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 288(2), G396-402.
- Baumgartner, H. K., Gerasimenko, J. V., Thorne, C., Ashurst, L. H., Barrow, S. L., Chvanov, M. A., Gillies, S., Criddle, D. N., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., Sutton, R., Watson, A. J., & Gerasimenko, O. V. (2007). Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative

- stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(1), G296-307.
- Benes, P., Vetvicka, V., & Fusek, M. (2008). Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Critical reviews in oncology/hematology*, 68(1), 12-28.
- Berger, N. A. (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation research*, 101(1), 4-15.
- Bewley, M. A., Marriott, H. M., Tulone, C., Francis, S. E., Mitchell, T. J., Read, R. C., Chain, B., Kroemer, G., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2011). A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci. *PLoS pathogens*, 7(1), e1001262.
- Bidere, N., Lorenzo, H. K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C., & Senik, A. (2003). Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 278(33), 31401-31411.
- Blankenship, J. W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V., Kirkpatrick, D. S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., Bazan, J. F., Fairbrother, W. J., Deshayes, K., & Vucic, D. (2009). Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *The Biochemical journal*, 417(1), 149-160.
- Blomgran, R., Zheng, L., & Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *Journal of leukocyte biology*, 81(5), 1213-1223.
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 15(6), 725-731.
- Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., & Snyder, S. H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature cell biology*, 5(12), 1051-1061.
- Bojič, L., Petelin, A., Stoka, V., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, V., & Turk, B. (2007). Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. *FEBS letters*, 581(27), 5185-5190.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology*, 39(11), 615-647.
- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., & Smulson, M. (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 22932-22940.
- Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27(50), 6434-6451.
- Bratton, S. B., & Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *Journal of cell science*, 123(Pt 19), 3209-3214.
- Brenner, D., Blaser, H., & Mak, T. W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature reviews. Immunology*, 15(6), 362-374.
- Brenner, D., & Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current opinion in cell biology*, 21(6), 871-877.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., & Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 90(2), 194-207.
- Butinar, M., Prebanda, M. T., Rajković, J., Jerić, B., Stoka, V., Peters, C., Reinheckel, T., Kruger, A., Turk, V., Turk, B., & Vasiljeva, O. (2014). Stefin B deficiency reduces tumor growth via sensitization of tumor cells to oxidative stress in a breast cancer model. *Oncogene*, 33(26), 3392-3400.
- Cantor, A. B., Baranski, T. J., & Kornfeld, S. (1992). Lysosomal enzyme phosphorylation. II. Protein recognition determinants in either lobe of procathepsin D are sufficient for

- phosphorylation of both the amino and carboxyl lobe oligosaccharides. *The Journal of biological chemistry*, 267(32), 23349-23356.
- Castino, R., Bellio, N., Nicotra, G., Follo, C., Trincerri, N. F., & Isidoro, C. (2007). Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free radical biology & medicine*, 42(9), 1305-1316.
- Crichton D., Wilkinson S., O'Prey J., Syed N., Smith P., Harrison P. R., Gasco M., Garrone O., Crook T. Ryan K. M. (2006). DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell*, 126: 121-134.
- Česen, M. H., Pegan, K., Špes, A., & Turk, B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Experimental cell research*, 318(11), 1245-1251.
- Česen, M. H., Repnik, U., Turk, V., & Turk, B. (2013). Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes. *Cell death & disease*, 4, e818.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C., & Gottlieb, R. A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), 30724-30728.
- Chiou, T. J., Chu, S. T., & Tzeng, W. F. (2003). Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation. *Toxicology*, 191(2-3), 77-88.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell*, 37(3), 299-310.
- Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D. C., Lecaille, F., Bogyo, M., Bromme, D., Ellman, J. A., & Craik, C. S. (2006). Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *The Journal of biological chemistry*, 281(18), 12824-12832.
- Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J., & Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, 96(5), 615-624.
- Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, 328(2), 222-225.
- Chwieralski, C. E., Welte, T., & Buhling, F. (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 11(2), 143-149.
- Cirman, T., Oresić, K., Mazovec, G. D., Turk, V., Reed, J. C., Myers, R. M., Salvesen, G. S., & Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *The Journal of biological chemistry*, 279(5), 3578-3587.
- Conus, S., Pop, C., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., & Simon, H. U. (2012). Cathepsin D primes caspase-8 activation by multiple intra-chain proteolysis. *The Journal of biological chemistry*, 287(25), 21142-21151.
- Conus, S., & Simon, H. U. (2010). Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss medical weekly*, 140, w13042.
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*, 2(9), 647-656.
- Cossarizza, A., Franceschi, C., Monti, D., Salvioli, S., Bellesia, E., Rivabene, R., Biondo, L., Rainaldi, G., Tinari, A., & Malorni, W. (1995). Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. *Experimental cell research*, 220(1), 232-240.
- Crawford, E. D., & Wells, J. A. (2011). Caspase substrates and cellular remodeling. *Annual review of biochemistry*, 80, 1055-1087.
- Dahl, S. W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., & Turk, B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry*, 40(6), 1671-1678.
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.

- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231-241.
- Davies, P. H., & Messer, M. (1984). Intestinal cathepsin B and D activities of suckling rats. *Biology of the neonate*, 45(4), 197-202.
- Deiss, L. P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., & Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *The EMBO journal*, 15(15), 3861-3870.
- DeLa Cadena, R. A., & Colman, R. W. (1991). Structure and functions of human kininogens. *Trends in pharmacological sciences*, 12(7), 272-275.
- Demoz, M., Castino, R., Cesaro, P., Baccino, F. M., Bonelli, G., & Isidoro, C. (2002). Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNFalpha, not by etoposide, in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of cathepsin D. *Biological chemistry*, 383(7-8), 1237-1248.
- Denault, J. B., & Salvesen, G. S. (2003). Expression, purification, and characterization of caspases. *Current protocols in protein science, Chapter 21*, Unit 21 13.
- Droga-Mazovec, G., Bojič, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G. S., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *The Journal of biological chemistry*, 283(27), 19140-19150.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 68, 383-424.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, 7(10), 988-994.
- Elkholi, R., Renault, T. T., Serasinghe, M. N., & Chipuk, J. E. (2014). Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? *Cancer & metabolism*, 2, 16.
- Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817-829.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50.
- Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459(7245), 371-378.
- Erickson, A. H. (1989). Biosynthesis of lysosomal endopeptidases. *Journal of cellular biochemistry*, 40(1), 31-41.
- Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Li, Z., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2006). Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(6), G1339-1346.
- Ferreira, K. S., Kreutz, C., Macnelly, S., Neubert, K., Haber, A., Bogyo, M., Timmer, J., & Borner, C. (2012). Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 17(5), 503-515.
- Ferri, K. F., & Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature cell biology*, 3(11), E255-263.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., & Jaattela, M. (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology*, 153(5), 999-1010.
- Fonović, M., & Turk, B. (2014). Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(8), 2560-2570.

- French, L. E., & Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell death and differentiation*, 10(1), 117-123.
- Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Sarchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., & Schutze, S. (2016). TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death. *Oncotarget*, 7(46), 75774-75789.
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(6), 329-344.
- Fuentes-Prior, P., & Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal*, 384(Pt 2), 201-232.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., & Linkermann, A. (2014). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in cell & developmental biology*, 35, 24-32.
- Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Palejwala, A., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., & Watson, A. J. (2002). Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca(2+) elevations and the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of cell science*, 115(Pt 3), 485-497.
- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A., & Von Figura, K. (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 97(1), 1-5.
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N. S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogyo, M., & Nepveu, A. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Molecular cell*, 14(2), 207-219.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312.
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899-1911.
- Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *The Journal of clinical investigation*, 106(9), 1127-1137.
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(6), 1625-1637.
- Guicciardi, M. E., Leist, M., & Gores, G. J. (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2881-2890.
- Guicciardi, M. E., Miyoshi, H., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2001). Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *The American journal of pathology*, 159(6), 2045-2054.
- Gutierrez, G. J., & Ronai, Z. (2006). Ubiquitin and SUMO systems in the regulation of mitotic checkpoints. *Trends in biochemical sciences*, 31(6), 324-332.
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, P. C., Zvelebil, M., Bujnicki, J. M., Lowe, S., Silke, J., & Meier, P. (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nature cell biology*, 10(11), 1309-1317.
- Gyrd-Hansen, M., Farkas, T., Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Hoyer-Hansen, M., Elling, F., Wallach, D., Flavell, R., Kroemer, G., Nylandsted, J., & Jaattela, M. (2006).

- Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 7880-7891.
- Haendeler, J., Popp, R., Goy, C., Tischler, V., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2005). Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 280(52), 42945-42951.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., & Schutze, S. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death and differentiation*, 11(5), 550-563.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Herceg, Z., & Wang, Z. Q. (2001). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutation research*, 477(1-2), 97-110.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348(6299), 334-336.
- Hsieh, M. H., Varadi, G., Flomenberg, N., & Korngold, R. (2002). Leucyl-leucine methyl ester-treated haploidentical donor lymphocyte infusions can mediate graft-versus-leukemia activity with minimal graft-versus-host disease risk. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 8(6), 303-315.
- Huai, J., Vogtle, F. N., Jockel, L., Li, Y., Kiefer, T., Ricci, J. E., & Borner, C. (2013). TNF α -induced lysosomal membrane permeability is downstream of MOMP and triggered by caspase-mediated NDUF51 cleavage and ROS formation. *Journal of cell science*, 126(Pt 17), 4015-4025.
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal*, 30(17), 3481-3500.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A. W., & Raff, M. C. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 6(11), 1443-1458.
- Ivanova, S., Repnik, U., Bojič, L., Petelin, A., Turk, V., & Turk, B. (2008). Lysosomes in apoptosis. *Methods in enzymology*, 442, 183-199.
- Jacobson, L. S., Lima, H., Jr., Goldberg, M. F., Gocheva, V., Tsiperson, V., Sutterwala, F. S., Joyce, J. A., Gapp, B. V., Blomen, V. A., Chandran, K., Brummelkamp, T. R., Diaz-Griffero, F., & Brojatsch, J. (2013). Cathepsin-mediated necrosis controls the adaptive immune response by Th2 (T helper type 2)-associated adjuvants. *The Journal of biological chemistry*, 288(11), 7481-7491.
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 4(2), 139-163.
- Jones, A. L., Hulett, M. D., & Parish, C. R. (2005). Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunology and cell biology*, 83(2), 106-118.
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C., Bouillet, P., Thomas, H. E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A., & Kaufmann, T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 460(7258), 1035-1039.
- Kagedal, K., Johansson, A. C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N. S., Jurgensmeier, J. M., & Ollinger, K. (2005). Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax? *International journal of experimental pathology*, 86(5), 309-321.
- Kagedal, K., Johansson, U., & Ollinger, K. (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(9), 1592-1594.
- Kaufmann, S. H., & Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in cell biology*, 11(12), 526-534.

- Kaufmann, T., Strasser, A., & Jost, P. J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation*, 19(1), 42-50.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khalkhali-Ellis, Z., & Hendrix, M. J. (2014). Two faces of cathepsin D: Physiological guardian angel and pathological demon. *Biology and medicine*, 6(2), pii: 1000206.
- Khwaja, A., & Tatton, L. (1999). Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, 274(51), 36817-36823.
- Kim, H., Tu, H. C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., & Cheng, E. H. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 36(3), 487-499.
- Kirkegaard T. & Jaattela M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4):746-54.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., & Rinne, A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *The Biochemical journal*, 264(2), 467-473.
- Klarić, M., Tao, S., Stoka, V., Turk, B., & Turk, V. (2009). Cysteine cathepsins are not critical for TNF-alpha-induced cell death in T98G and U937 cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(9), 1372-1377.
- Koike, M., Shibata, M., Ohsawa, Y., Nakanishi, H., Koga, T., Kametaka, S., Waguri, S., Momoi, T., Kominami, E., Peters, C., Figura, K., Saftig, P., & Uchiyama, Y. (2003). Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Molecular and cellular neurosciences*, 22(2), 146-161.
- Kroemer, G., Galluzzi L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87 (1), 99-163.
- 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., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., & Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3-11.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2008). Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(11), 1291-1303.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111(3), 331-342.
- Laurent-Matha, V., Derocq, D., Prebois, C., Katunuma, N., & Liaudet-Coopman, E. (2006). Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *Journal of biochemistry*, 139(3), 363-371.
- Leist, M., & Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(8), 589-598.
- Lenarčič, B., Kos, J., Dolenc, I., Lučovnik, P., Križaj, I., & Turk, V. (1988). Cathepsin D inactivates cysteine proteinase inhibitors, cystatins. *Biochemical and biophysical research communications*, 154(2), 765-772.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
- Lieuallen, K., Pennacchio, L. A., Park, M., Myers, R. M., & Lennon, G. G. (2001). Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes. *Human molecular genetics*, 10(18), 1867-1871.

- 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. (2003). NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *The EMBO journal*, 22(19), 5313-5322.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2), 175-184.
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J. M., Chandel, N. S., Vanden Hoek, T. L., & Schumacker, P. T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 49(12), 1925-1936.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481-490.
- MacEwan, D. J. (2002). TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British journal of pharmacology*, 135(4), 855-875.
- Man, S. M., & Kanneganti, T.-D. (2016). Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 16(1), 7-21.
- Mandić, A., Viktorsson, K., Strandberg, L., Heiden, T., Hansson, J., Linder, S., & Shoshan, M. C. (2002). Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 22(9), 3003-3013.
- Marques, C., Oliveira, C. S., Alves, S., Chaves, S. R., Coutinho, O. P., Corte-Real, M., & Preto, A. (2013). Acetate-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D release. *Cell death & disease*, 4, e507.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656.
- Meier, P., Finch, A., & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805), 796-801.
- Metcalf, P., & Fusek, M. (1993). Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *The EMBO journal*, 12(4), 1293-1302.
- Miller, D. K., Griffiths, E., Lenard, J., & Firestone, R. A. (1983). Cell killing by lysosomotropic detergents. *The Journal of cell biology*, 97(6), 1841-1851.
- Minarowska, A., Minarowski, L., Karwowska, A., & Gacko, M. (2007). Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 45(3), 159-163.
- Mohamed, M. M., & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(10), 764-775.
- Nagaraj, N. S., Vigneswaran, N., & Zacharias, W. (2006). Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(3), 171-183.
- Nilsson, C., Johansson, U., Johansson, A. C., Kagedal, K., & Ollinger, K. (2006). Cytosolic acidification and lysosomal alkalinization during TNF-alpha induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 11(7), 1149-1159.
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., & Jaattela, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of experimental medicine*, 200(4), 425-435.
- Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P. G., Buellesbach, J., & Borner, C. (2010). Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is

- a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell death and differentiation*, 17(7), 1167-1178.
- Oliveira, C. S., Pereira, H., Alves, S., Castro, L., Baltazar, F., Chaves, S. R., Preto, A., & Corte-Real, M. (2015). Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria. *Cell death & disease*, 6, e1788.
- Orr, W. C., & Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263(5150), 1128-1130.
- Ostenfeld, M. S., Fehrenbacher, N., Hoyer-Hansen, M., Thomsen, C., Farkas, T., & Jaattela, M. (2005). Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer research*, 65(19), 8975-8983.
- Ozoren, N., & El-Deiry, W. S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*, 4(6), 551-557.
- Pajak, B., Gajkowska, B., & Orzechowski, A. (2005). Cycloheximide-mediated sensitization to TNF-alpha-induced apoptosis in human colorectal cancer cell line COLO 205; role of FLIP and metabolic inhibitors. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 56 Suppl 3, 101-118.
- Pennacchio, L. A., Bouley, D. M., Higgins, K. M., Scott, M. P., Noebels, J. L., & Myers, R. M. (1998). Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nature genetics*, 20(3), 251-258.
- Pereira, W. O., & Amarante-Mendes, G. P. (2011). Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scandinavian journal of immunology*, 73(5), 401-407.
- Petersen, S. L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P., & Wang, X. (2007). Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer cell*, 12(5), 445-456.
- Petersen, N. H., Kirkegaard T., Olsen O. D. & Jaattela M. (2010). Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. *Cell cycle*, 9(12), 2010.
- Ponten, F., Schwenk, J. M., Asplund, A., & Edqvist, P. H. (2011). The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery. *Journal of internal medicine*, 270(5), 428-446.
- Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry*, 284(33), 21777-21781.
- Pungerčar, J. R., Caglič, D., Sajid, M., Dolinar, M., Vasiljeva, O., Požgan, U., Turk, D., Bogyo, M., Turk, V., & Turk, B. (2009). Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity. *The FEBS journal*, 276(3), 660-668.
- Puthalakath, H., & Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell death and differentiation*, 9(5), 505-512.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D160-164.
- Reed, J. C. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(2), 111-121.
- Reiser, J., Adair, B., & Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 120(10), 3421-3431.
- Repnik, U., Hafner Česen, M., & Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. *Mitochondrion*, 19 Pt A, 49-57.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(1), 22-33.
- Reynolds, J. L., Skepper, J. N., McNair, R., Kasama, T., Gupta, K., Weissberg, P. L., Jahnen-Dechent, W., & Shanahan, C. M. (2005). Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(10), 2920-2930.

- Ribe, E. M., Serrano-Saiz, E., Akpan, N., & Troy, C. M. (2008). Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *The Biochemical journal*, 415(2), 165-182.
- Richardson, H., & Kumar, S. (2002). Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *Journal of immunological methods*, 265(1-2), 21-38.
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), 405-413.
- Roberg, K., & Ollinger, K. (1998). Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *The American journal of pathology*, 152(5), 1151-1156.
- Roschitzki-Voser, H., Schroeder, T., Lenherr, E. D., Frolich, F., Schweizer, A., Donepudi, M., Ganesan, R., Mittl, P. R., Baici, A., & Grutter, M. G. (2012). Human caspases in vitro: expression, purification and kinetic characterization. *Protein expression and purification*, 84(2), 236-246.
- Saftig, P., Hetman, M., Schmahl, W., Weber, K., Heine, L., Mossmann, H., Koster, A., Hess, B., Evers, M., von Figura, K., & et al. (1995). Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *The EMBO journal*, 14(15), 3599-3608.
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), 623-635.
- Sagulenko, V., Muth, D., Sagulenko, E., Paffhausen, T., Schwab, M., & Westermann, F. (2008). Cathepsin D protects human neuroblastoma cells from doxorubicin-induced cell death. *Carcinogenesis*, 29(10), 1869-1877.
- Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91(4), 443-446.
- Samarel, A. M., Ferguson, A. G., Decker, R. S., & Lesch, M. (1989). Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. *The American journal of physiology*, 257(6 Pt 1), C1069-1079.
- Sawai, H. (2013). Differential effects of caspase inhibitors on TNF-induced necroptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(3), 451-455.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*, 17(6), 1675-1687.
- Seaman, J. E., Julien, O., Lee, P. S., Rettenmaier, T. J., Thomsen, N. D., & Wells, J. A. (2016). Cacidases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death and Differentiation*, 23(10), 1717-1726.
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine & growth factor reviews*, 25(4), 453-472.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158-167.
- Serrano-Puebla, A. & Boya, P. (2016). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease. *The New York Academy of Sciences*, 1371: 30-44.
- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology*, 4(5), E131-136.
- Shi, Y. (2001). A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature structural biology*, 8(5), 394-401.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*, 87(7), 1157-1180.

- Snipas, S. J., Drag, M., Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (2008). Activation mechanism and substrate specificity of the *Drosophila* initiator caspase DRONC. *Cell death and differentiation*, 15(5), 938-945.
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A., & Salvesen, G. S. (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends in biochemical sciences*, 27(2), 94-101.
- 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. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), 3149-3157.
- Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2007). Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biological chemistry*, 388(6), 555-560.
- Suguna, K., Padlan, E. A., Smith, C. W., Carlson, W. D., & Davies, D. R. (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20), 7009-7013.
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9), 621-632.
- Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2006). Lysosomal labilization. *IUBMB life*, 58(9), 531-539.
- Thiele, D. L., & Lipsky, P. E. (1986). The immunosuppressive activity of L-leucyl-L-leucine methyl ester: selective ablation of cytotoxic lymphocytes and monocytes. *Journal of immunology*, 136(3), 1038-1048.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(9), 785-799.
- Turk, B., Colić, A., Stoka, V., & Turk, V. (1994a). Kinetics of inhibition of bovine cathepsin S by bovine stefin B. *FEBS letters*, 339(1-2), 155-159.
- Turk, B., Dolenc, I., Turk, V., & Bieth, J. G. (1993a). Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, 32(1), 375-380.
- Turk, B., Dolenc, I., Žerovnik, E., Turk, D., Gubenšek, F., & Turk, V. (1994b). Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site. *Biochemistry*, 33(49), 14800-14806.
- Turk, B., Križaj, I., Kralj, B., Dolenc, I., Popović, T., Bieth, J. G., & Turk, V. (1993b). Bovine stefin C, a new member of the stefin family. *The Journal of biological chemistry*, 268(10), 7323-7329.
- Turk, B., & Stoka, V. (2007). Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS letters*, 581(15), 2761-2767.
- Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungerčar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Oresić, K., & Turk, V. (2002a). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biological chemistry*, 383(7-8), 1035-1044.
- Turk, B., Turk, D., & Salvesen, G. S. (2002b). Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current pharmaceutical design*, 8(18), 1623-1637.
- Turk, B., Turk, D., & Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et biophysica acta*, 1477(1-2), 98-111.
- Turk, B., & Turk, V. (2009). Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *The Journal of biological chemistry*, 284(33), 21783-21787.
- Turk, B., Turk, V., & Turk, D. (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological chemistry*, 378(3-4), 141-150.
- Turk, D., Gunčar, G., Podobnik, M., & Turk, B. (1998). Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biological chemistry*, 379(2), 137-147.

- Turk, V., & Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS letters*, 285(2), 213-219.
- Turk, V., Stoka, V., & Turk, D. (2008). Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 5406-5420.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(1), 68-88.
- Turk, V., Turk, B., Gunčar, G., Turk, D., & Kos, J. (2002c). Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Advances in enzyme regulation*, 42, 285-303.
- Turk, V., Turk, B., & Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO journal*, 20(17), 4629-4633.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), 335-344.
- Twining, S. S. (1994). Regulation of proteolytic activity in tissues. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 29(5), 315-383.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., & Hamada, M. (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *The Journal of antibiotics*, 23(5), 259-262.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhout, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(2), 135-147.
- Vasiljeva, O., Dolinar, M., Pungerčar, J. R., Turk, V., & Turk, B. (2005). Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS letters*, 579(5), 1285-1290.
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., & Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current pharmaceutical design*, 13(4), 387-403.
- Vidmar, R., Vizovišek M., Turk D., Turk B., Fonović M. (2017). Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain. *The EMBO Journal*, 36, 2455-2465.
- Villalpando Rodriguez, G. E., Torriglia A. (2013). Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2. *Biochimica et biophysica acta*, 1833: 2560-2570.
- Vitale I., Manić G., Kroemer G., Galluzzi L. Mitochondria in Cell Death Regulation. V: Ralph A Bradshaw in Philip D. Stahl (Odgovorna urednika), Encyclopedia of Cell Biology, Vol 3, Waltham, MA: Academic Press, 2016, pp. 341-353
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, 10(1), 45-65.
- Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S., Thirion, J., Gasingirwa, M. C., & Jadot, M. (2007). Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *The Biochemical journal*, 403(1), 89-95.
- Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D., & Raff, M. C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 133(5), 1053-1059.
- Werneburg, N., Guicciardi, M. E., Yin, X. M., & Gores, G. J. (2004). TNF-alpha-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 287(2), G436-443.
- Werneburg, N. W., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 283(4), G947-956.

- Werneburg, N. W., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2007). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *The Journal of biological chemistry*, 282(39), 28960-28970.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., & Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400(6747), 886-891.
- Yip, K. W., & Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398-6406.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297(5579), 259-263.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652.
- Zaidi, N., Burster, T., Sommandas, V., Herrmann, T., Boehm, B. O., Driessen, C., Voelter, W., & Kalbacher, H. (2007). A novel cell penetrating aspartic protease inhibitor blocks processing and presentation of tetanus toxoid more efficiently than pepstatin A. *Biochemical and biophysical research communications*, 364(2), 243-249.
- Zavašnik-Bergant, T., & Turk, B. (2006). Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue antigens*, 67(5), 349-355.
- Železnik, T. Z., Kadin, A., Turk, V., & Dolenc, I. (2015). Aspartic cathepsin D degrades the cytosolic cysteine cathepsin inhibitor stefin B in the cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(2), 213-217.
- Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J. W., & Brunk, U. T. (2003). Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *European journal of biochemistry*, 270(18), 3778-3786.
- Zhu, H., Yoshimoto, T., & Yamashima, T. (2014). Heat Shock Protein 70.1 (Hsp70.1) Affects Neuronal Cell Fate by Regulating Lysosomal Acid Sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27432-27443.
- Zuhlsdorf, M., Imort, M., Hasilik, A., & von Figura, K. (1983). Molecular forms of beta-hexosaminidase and cathepsin D in serum and urine of healthy subjects and patients with elevated activity of lysosomal enzymes. *The Biochemical journal*, 213(3), 733-740.

Bibliografija

Članek

Bidovec, K., Božic, J., Dolenc, I., Turk, B., Turk, V., & Stoka, V. (2017). Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Apoptosis in U937 Cells Promotes Cathepsin D-Independent Stefin B Degradation. *Journal of cellular biochemistry*. doi: 10.1002/jcb.26152

Prispevka na konferenci

Stoka, V., Puizdar, V., Jerič, B., Zajc, T., Bidovec, K., Dolenc, I., Turk, V. Role of cathepsins D and F in human neuronal ceroid lipofucinos. V: GAMS, Matjaž (ur.), et al. Zbornik 16. mednarodne multikonference Informacijska družba - IS 2013, 7.-11. oktober 2013 [Ljubljana, Slovenija] : zvezek A = Proceedings of the 16th International Multiconference Information Society - IS 2013, October 7th-11th, 2013, Ljubljana, Slovenia : volume A. Ljubljana: Institut Jožef Stefan. 2013, str. 366-369.

Bidovec K., Stoka V., Turk V. Apoptosis triggered by TNF α in U937 cell line is independent of cysteine cathepsins and cathepsin D. V: Dolinar, M. (ur.), Stoka, V. (ur.), Turk, B. (ur.). XIVth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control – Book of abstracts. (Jožef Stefan Institute, Ljubljana, 2014).

Bidovec, K., Stoka V., Turk V. (2014). TNF α -induced apoptosis in U937 cell line is independent of cathepsin D and cysteine cathepsins. 6th Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference, 20.-22. 05. 2014, Ljubljana. TRDIN, Nejc (ur.), et al. Zbornik : 1. del = Proceedings : part 1, Ljubljana: Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, 2014, 204-214.

Biografija

Avtorica je l. 2004 zaključila izobraževanje na gimnaziji Poljane-smer klasična gimnazija kot zlata maturantka. Po končani maturi je pridobila certifikat British Council iz aktivnega znanja angleškega jezika. Leta 2009 je z zagovorom diplome z naslovom »Analiza endopoliploidnih jeder melone (*Cucumis melo*)« zaključila študij na Biotehniški fakulteti v Ljubljani-smer molekularna biologija ter kot najuspešnejša študentka v vseh letih študija prejela Jesenkovo nagrado Biotehniške fakultete. Tekom študija je bila kot študentka zaposlena na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, v Enoti za parazitologijo, kjer je opravljala delo laboratorijske asistentke na področju genske tipizacije kokcidijev ter na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani, kjer je delala na področju diagnostike fitoplazem. Leta 2009 se je kot mlada raziskovalka zaposlila na Institutu »Jožef Stefan«, kjer zaključuje doktorski študij z naslovom »Vloga katepsina D pri apoptozi sproženi s TNF α in menadionom« pod mentorstvom prof. dr. Veronike Stoka. Tekom doktorskega študija je avtorica aktivno sodelovala pri organizaciji 10. Srečanja Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo. Sodelovala je tudi na 14. Mednarodnem simpoziju o Proteazah, Inhibitorjih ter Biološki kontroli ter se udeležila 6. Študentske konference Mednarodne podiplomske šole Jožeta Stefana, kjer je pridobila Priznanje za predstavitev raziskovalnih dosežkov z vidika znanstvene kakovosti in njihove uporabnosti.