

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

ROLE KASPÁZ V PROCESECH BUNĚČNÉ SMRTI

Autor: Barbora Martínková

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Handl

Konzultant: Mgr. Jan Čapek

Bakalářská práce

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

THE ROLE OF CASPASES IN CELL DEATH PROCESSES

Author: Barbora Martínková

Supervisor: Mgr. Jiří Handl

Consultant: Mgr. Jan Čapek

Bachelor thesis

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Martínková**
Osobní číslo: **C16261**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Role kaspáz v procesech buněčné smrti**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Vypracujte literární rešerši o roli kaspáz v procesech buněčné smrti. V první části textu bakalářské práce charakterizujte kaspázy včetně jejich struktury a funkčního zařazení. Dále uveďte, jakým způsobem lze kaspázy klasifikovat a zaměřte se také na popis mechanismů jejich aktivace. Uveďte stručný přehled základních typů buněčné smrti.
- 2) V hlavní části bakalářské práce porovnejte roli kaspáz v procesu programované buněčné smrti apoptózy a nekrotické buněčné smrti. Charakterizujte, jak probíhá aktivace na kaspázách nezávislé buněčné smrti. Popište, jakou úlohu hrají kaspázy u pyroptózy a dalších typů buněčné smrti.
- 3) Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *Science-Direct*, *Web of Science*, *Scopus*, *apod.*

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Jiří Handl

Katedra biologických a biochemických věd


Konzultant bakalářské práce:

Mgr. Jan Čapek

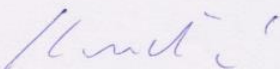
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 21. 6. 2019

Barbora Martínková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Handlovi za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady, vstřícnost při konzultacích a věnovaný čas během vypracování práce.

Anotace

Tato bakalářská práce je věnována popisu role kaspáz v procesech buněčné smrti. V první části práce jsou charakterizovány kaspázy, včetně jejich struktury a rozdělení. Dále je popsána jejich klasifikace, a také je vysvětlen mechanismus jejich aktivace. Hlavní část práce pojednává o roli kaspáz v procesu programované buněčné smrti apoptózy a v procesu nekrotické buněčné smrti. V práci je také popsána úloha vybraných kaspáz ve fyziologických i patologických procesech, jakými mohou být zánět nebo hojení ran. Dále je uveden možný vliv inhibice kaspáz na fyziologické procesy v organismu. Popsáno je i to, jakou úlohu hrají kaspázy u pyroptózy a u některých dalších typů buněčné smrti, včetně aktivace na kaspázách nezávislé buněčné smrti.

Klíčová slova

kaspázy, programovaná buněčná smrt, nekróza, pyroptóza, autofagie

Annotation

This bachelor thesis is dedicated to the description of the role of caspases in processes of the cell death. In the first part of the thesis caspases are characterized including their structure. The next part of the thesis describes the classification of caspases and also explains the mechanism of their activation. The main part of the thesis deals with the role of caspases in the process of programmed cell death called apoptosis and in the process of necrotic cell death. This bachelor thesis also describes the role of selected caspases in physiological and pathological processes such as inflammation or wound healing. Further, the possible effect of caspases inhibition on physiological processes in the organism is discussed. There is also described the role of caspases in pyroptosis and the caspases role in other types of cell death including activation of caspase-independent cell death.

Keywords

caspases, programmed cell death, necrosis, pyroptosis, autophagy

Obsah:

Úvod	13
1. Kaspázy	14
1.1 Rozdělení kaspáz	14
1.2 Struktura kaspáz	15
1.3 Aktivace kaspáz	16
2. Apoptóza.....	18
2.1 Kaspáza-1	19
2.2 Dvojitá role kaspázy-8	20
2.3 Kaspáza-10	20
2.4 Kaspáza-12 a její spojitost s apoptózou vyvolanou stresem endoplazmatického retikula	21
2.5 Spojitost kaspáz a apoptózy s procesy stárnutí	22
2.6 Role kaspáz při tvorbě nádorů	23
3. Nekróza.....	25
3.1 Role kaspáz při nekróze	26
4. Další formy buněčné smrti.....	28
4.1 Pyroptóza	28
4.1.1 Role kaspáz při tvorbě inflamazómů	29
4.2 Nekroptóza	30
4.2.1 Spojitost mezi nekroptózou a apoptózou	31
4.2.2 Role kaspáz v nekroptóze	32
4.3 Autofagie	32
4.3.1 Spojitost mezi autofagií a jinými typy buněčné smrti	33
4.3.2 Role kaspáz v autofagii	34
4.4 Onkóza	34
4.4.1 Role kaspáz při onkóze a její souvislost s jinými typy buněčné smrti	35

5. Na kaspázách nezávislá buněčná smrt	36
5.1 <i>Aktivace buněčné smrti nezávislé na kaspázách</i>	36
5.2 <i>Parthanatos</i>	38
6. Detekce aktivity kaspáz <i>in vitro</i>	40
7. Závěr	41
8. Seznam použité literatury	42

Seznam zkratk:

AFAC10	komplex AK2-FADD-kaspáza-10
AIF	apoptózu indukující faktor
AIM2	senzor chybějící v melanomu 2
AK2	adenylátkináza 2
APAF-1	apoptotický aktivační faktor-1
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	protein B-buněčného lymfomu 2
Bcl-XL	velký protein B-buněčného lymfomu
CARD	kaspázová aktivační doména
CLR	lektinové receptory typu C
crmA	modifikátor A cytokinové odpovědi
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DD	smrtící doména
DED	smrtící efektorová doména
DEVD	kyselina asparagová-kyselina glutamová-valin-kyselina asparagová
DISC	smrt indukující signální komplex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dUTP	deoxyuridin trifosfát
endoG	endonukleáza G
ER	endoplazmatické retikulum
FADD	Fas asociovaný protein s doménou smrti
Fas	membránový protein CD95
FasL	Fas ligand
FLACA	fluorescenčně značené inhibitory kaspáz
FLIP	FLICE inhibiční protein
GBP	guanylát vázající protein
HtrA2/Omi	serin peptidáza 2
IL-1	interleukin-1
IL-18	interleukin-18
LPS	lipopolysacharid
NLR	receptory podobné genu „Nod“

PARP1	poly (ADP-ribóza) polymeráza 1
PI	propidium jodid
PRR	receptor rozpoznávající vzor
PS	fosfatidylserin
PTPC	komplex s přechodnou pórovitou permeabilitou
RIP1	receptorové interakce serin-threonin-kináza 1
RIP3	receptorové interakce serin-threonin-kináza 3
RLR	receptory podobné kyselině retinové
ROS	reaktivní formy kyslíku
SC	satelitní buňky
Smac	druhý aktivátor kaspáz odvozený od mitochondrií
TLR	receptory podobné genu „Toll“
TNF	faktor nádorové nekrózy
TNF-2	faktor-2 nádorové nekrózy
TNFR-1	receptory pro nekrotický nádorový faktor
YVAD	tyrosin-valin-alanin-kyselina asparagová

Úvod

Kaspázy jsou důležité enzymy, které se podílejí na řízení zánětu a některých typů buněčné smrti. Jednotlivé kaspázy je možno klasifikovat do několika skupin podle toho, jakých dějů se v organizmu účastní nebo dle struktury jejich prodomény. Aby mohly být kaspázy účinné, musí být aktivovány. Aktivace může probíhat dvěma způsoby, první způsob je vyvolaný smrtícím signálem, nebo smrtícím receptorem, druhý způsob může být zprostředkován mitochondriemi nebo stresem endoplazmatického retikula.

Apoptóza je fyziologický proces, který je důležitý pro udržení homeostázy, ve kterém mají kaspázy nezastupitelnou roli. Kaspázy mají rovněž důležitou úlohu při zánětu, v procesech stárnutí, při hojení ran nebo při tvorbě nádorů a vzniku některých onemocnění. K přechodu od apoptózy k nekróze, tedy trvalému poškození buněk škodlivými podněty, může docházet při inhibici aktivity kaspázy, stejně tak jako nedostatečná exprese může vést k programované nekróze. Kaspázy se dále účastní zánětlivé formy buněčné smrti neboli pyroptózy a ovlivňují autofagii, která může být také označována jako buněčné „samonatrávení“.

Kaspázy, však v některých případech nejsou nepostradatelné pro proces buněčné smrti. V takových situacích se tedy jedná o aktivaci na kaspázách nezávislé buněčné smrti. Příkladem na kaspázách nezávislého typu buněčné smrti je Parthanatos.

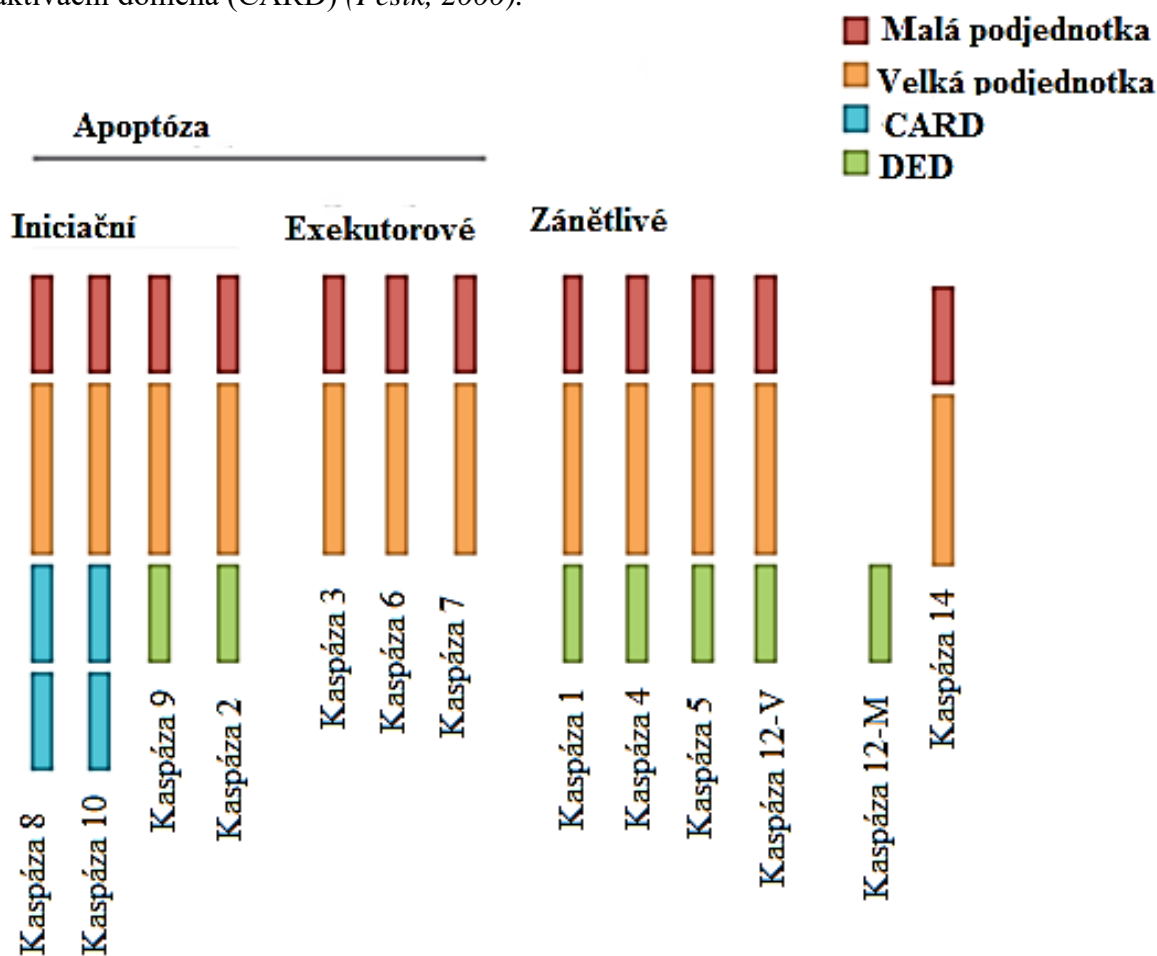
1. Kaspázy

Kaspázy jsou enzymy, které patří do skupiny asparát-specifických cysteinových proteáz. Odtud pochází i název kaspáza resp. z angl. caspases - cytosolic asparatate specific cystein proteases. Kaspázy jsou syntetizovány jako inaktivní prekurzory enzymů, neboli zymogeny, které mohou být aktivovány vazbou na apoptotický aktivační faktor-1 (APAF-1) nebo proteolytickým štěpením jinou kaspázou. Tento proces je označován jako autoaktivace (*Ficková and Nagy, 2007*). Zymogeny obsahují N-koncový peptid neboli prodoménu, společně s jednou velkou podjednotkou (p20) o velikosti 20 kDa a jednou malou podjednotkou (p10) o přibližné velikosti 10 kDa (*Thornberry and Lazebnik, 1998*). Kaspázy se podílejí na řízení zánětu a buněčné smrti, označované jako apoptóza. Aktivace kaspáz vede k produkci aktivních cytokinů podporujících zánět a k podpoře vrozené imunitní odpovědi na různé vnitřní i vnější podněty. Porucha regulace kaspáz je základem řady onemocnění včetně rakoviny. Dále má také spojitost se zánětlivými onemocněními a s onemocněními, jako je diabetes, dna, periodický syndrom spojený s kryopyrinem, Kawasakiho onemocnění, autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, Alzheimerova choroba a další onemocnění. V případě lepšího pochopení toho, jak tyto enzymy fungují a jak je lze regulovat, by mohlo dojít k zefektivnění léčby výše zmíněných onemocnění (*McIlwain et al., 2013*).

1.1 Rozdělení kaspáz

Celkem bylo identifikováno 14 kaspáz. Kaspázy jsou klasifikovány do několika skupin a to z několika pohledů. První způsob jejich dělení je podle toho, čeho se v organismu účastní. Z tohoto pohledu rozlišujeme dvě hlavní skupiny. První skupinu tvoří kaspázy podílející se na apoptóze, tam patří kaspázy-3, -6, -7, -8 a -9 u savců, ty jsou ještě dále děleny do podskupin dle jejich mechanismu účinku na iniciační: kaspázy-8 a -9 a exekutorové: kaspázy-3, -6 a -7. Druhou skupinu tvoří kaspázy účastnící se zánětu, tam řadíme kaspázy-1, -4, -5, -12 u lidí a kaspázy-1, -11, -12 u myši (obr. 1). Funkce kaspázy-2, -10 a -14 nejsou tak snadno kategorizovány (*McIlwain et al., 2013*). Další dělení kaspáz je založeno na struktuře prodomény. Z tohoto pohledu jsou kaspázy rozděleny do tří hlavních skupin: zánětlivé, iniciační apoptotické a efektorové. Kaspázy, které mají dlouhou prodoménu jsou označovány jako zánětlivé, sem patří kaspázy-1, -4, -5, -11, -13, -14 a dále iniciační apoptotické kaspázy, kam

řadíme kaspázy-2, -8, -9, -10. Kaspázy s krátkou prodoménou, obsahující 20 až 30 aminokyselin, se nazývají efektorové kaspázy: kaspázy-3, -6, -7. Dlouhé prodomény prokaspáz obsahují strukturální motivy, které patří k tzv. nadřazené doméně smrti (Martinon et al., 2001; Weber and Vincenz, 2001). Smrtící domény obsahují 80 až 100 aminokyselin a podílejí se na transdukci apoptotického signálu. Do této nadřazené domény patří smrtící doména (DD), smrtící efektorová doména (DED) a kaspázová aktivační doména (CARD) (Fesik, 2000).



Obrázek č. 1: Struktura domén lidských kaspáz,

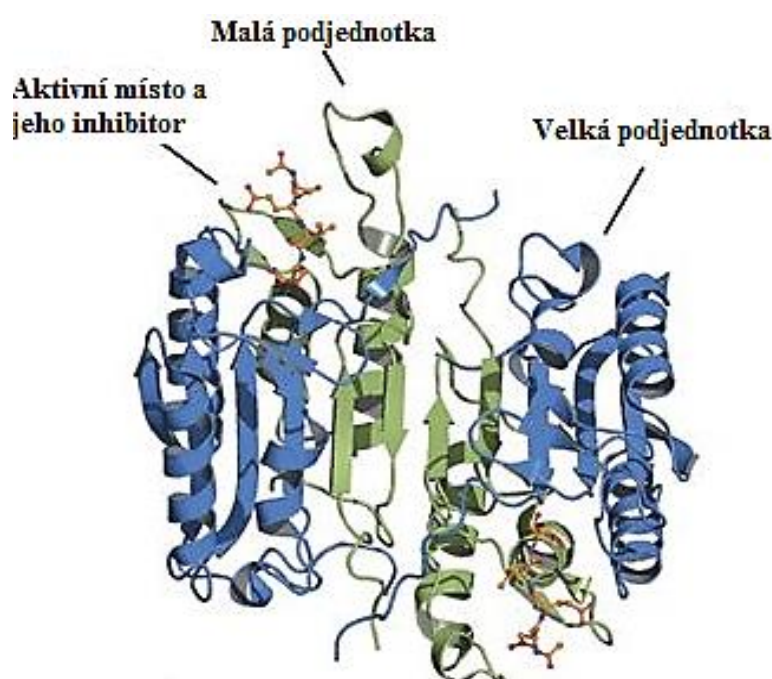
Doména pro získávání kaspázy - CARD, Smrtící efektorová doména – DED

(Převzato a upraveno z: McIlwain et al., 2013).

1.2 Struktura kaspáz

Kaspázové zymogeny jsou jednořetězcové proteiny s N-koncovými prodoménami přecházejícími v konzervované katalytické domény. Vyskytují se jako monomery nebo dimery, což je rozhodující vlastnost definující jejich aktivační

mechanizmy. Během aktivace a dozrávání je katalytická doména štěpena na velkou podjednotku α a malou podjednotku β , které spolu vzájemně úzce interagují (obr. 2). V aktivní formě jsou kaspázy dimery se symetrickou katalytickou doménou $\alpha\beta\beta'\alpha'$ s dvěma aktivními místy v molekule (Denault et al., 2006). Velká podjednotka obsahuje katalytické zbytky cysteinu a histidinu, zatímco malá podjednotka dodává několik zbytků tvořících drážku pro vazbu substrátu. Nestrukturované oblasti spojující prodomény a katalytické domény nebo oblasti spojující dvě podjednotky jsou často objektem (auto)proteolýzy během dozrávání (Pop and Salvesen, 2009).



Obrázek č. 2: Struktura kaspázy,
(Převzato a upraveno z: Julien and Wells, 2017).

1.3 Aktivace kaspáz

Obecně existují dva způsoby, kterými mohou být kaspázy aktivovány. První způsob je indukovaný smrtícím signálem nebo zprostředkovaný smrtícím receptorem. Druhý způsob je vyvolaný stresem nebo zprostředkován mitochondriemi (Fan, et al., 2005).

Aktivace zprostředkovaná smrtícím receptorem se týká kaspázy-8 a -10. Signalizace buněčné smrti prostřednictvím Fas ligandu (FasL) a faktoru-2 nádorové nekrózy (TNF-2), jsou specificky rozpoznávány odpovídajícími smrtícími receptory

jako je membránový protein CD98 (Fas) nebo receptory pro nádorový nekrotický faktor (TNFR-1), které se nacházejí v plazmatické membráně. Po navázání dochází k aktivaci smrtících receptorů. Fas může být navázán na Fas asociovaný protein s doménou smrti (FADD) a způsobovat agregaci a odhalení DED. Tyto odhalené DED poté interagují s DED v prodromě prokaspázy-8, což vyvolá oligomeraci kaspázy-8 lokalizované na cytosolové straně plazmatické membrány. Poté vznikne masivní komplex známý jako smrt indukující signální komplex (DISC). Následně dochází k autoaktivaci prokaspázy-8 na kaspázu-8. Aktivace prokaspázy-2 probíhá také pomocí smrtícího receptoru. Dochází k vazbě smrtících signálů na odpovídající smrtící receptory na plazmatické membráně, čímž dochází k jejich aktivaci. Následně dochází k aktivaci prokaspázy-2 na kaspázu-2 (*Fan et al., 2005*).

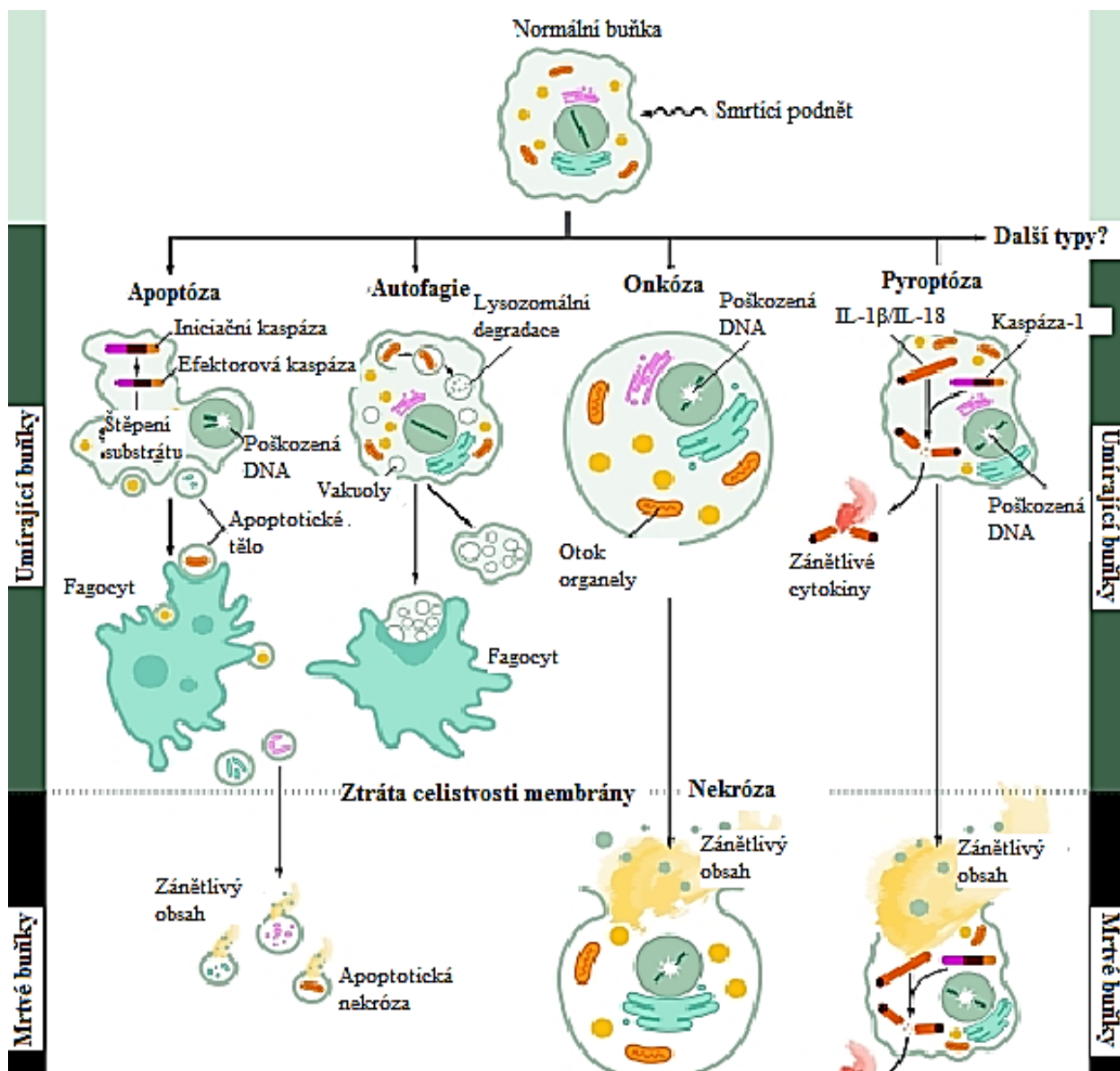
Aktivace zprostředkovaná mitochondriemi se týká kaspázy-8 a -9. Každá z těchto cest aktivace je mírně odlišná. Kromě vytvoření komplexu DISC po autoaktivaci, může být aktivována prokaspáza-8 ještě cestou závislou na cytochromu c. Poté co je cytochrom c uvolněn z mitochondrií do cytosolu, je kaspáza-6, která se nachází v cytosolu, schopna aktivovat prokaspázu-8. Při této aktivaci nedochází k interakci s FADD ani k tvorbě komplexu DISC (*Cowling et al., 2002*).

Při buněčném stresu, např. při poškození DNA, dochází k aktivaci proapoptických proteinů v cytosolu a dojde k otevření permeabilních přechodných pórů mitochondrií. V důsledku toho se do cytosolu uvolní cytochrom c lokalizovaný v mitochondriích. S přítomností deoxyadenosintrifosfátu (dATP) nebo adenosintrifosfátu (ATP) oligomeruje APAF-1. Společně s cytosolickou prokaspázou-9, dATP a cytochromem c, může vést oligomerizovaný komplex APAF-1 k tvorbě masivního komplexu označovaného jako apoptozom. Po jeho vytvoření může dojít k aktivaci prokaspázy-9. Aktivovaná kaspáza-9 může aktivovat prokaspázu-3 a prokaspázu-7. Aktivovaná kaspáza-3 může aktivovat prokaspázu-9 a tím se vytváří pozitivní zpětná aktivace (*Arnoult et al., 2003; Fan et al., 2001*).

2. Apoptóza

Apoptóza, nebo také programovaná buněčná smrt představuje aktivaci iniciačních kaspáz, které aktivují efektorové kaspázy pro štěpení buněčných substrátů. U apoptotických buněk dochází k cytoplazmatické a jaderné kondenzaci, poškození DNA, tvorbu apoptotických tělísek, udržení celistvé buněčné membrány a vystavení povrchových molekul (obr. 3) (*Fink and Cookson, 2005*). Apoptóza je základním fyziologickým procesem, který hraje zásadní roli ve vývoji a udržování tkáňové homeostázy. Proces programované buněčné smrti není, na rozdíl od nekrózy, doprovázen vznikem zánětlivé reakce. Průběh apoptózy je regulován sérií signálních kaskád. Kaspázový kaskádovitý systém hraje zásadní roli v indukci, transdukci a amplifikaci intracelulárních apoptotických signálů (*Fan et al., 2001*).

Apoptóza je považována za životně důležitou součást různých procesů, včetně fyziologické obměny buněk, správného rozvoje a fungování imunitního systému, atrofie závislé na hormonech, embryonálního vývoje a chemicky indukované buněčné smrti. Apoptóza, která probíhá v příliš velkém nebo naopak malém rozsahu může vypovídat o mnoha lidských stavech, včetně neurodegenerativních onemocnění, ischemického poškození, autoimunitních poruch a mnoha druhů rakoviny. Schopnost modulace buněčné smrti má velký terapeutický potenciál, i proto se výzkum i nadále zaměřuje na objasnění a analýzu procesů buněčného cyklu a přidružených signálních cest. Ačkoli mnoho klíčových apoptotických proteinů bylo identifikováno, molekulární mechanismy působení nebo nečinnosti těchto proteinů zůstávají stále neobjasněny (*Elmore, 2007*).



Obrázek č. 3: Cesty vedoucí k různým způsobům buněčné smrti,

Interleukin - IL

(Převzato a upraveno z: *Fink and Cookson, 2005*).

2.1 Kaspáza-1

Kaspáza-1 patří mezi kaspázy, které se nejčastěji účastní zánětu. Ovšem její zvýšená aktivita může způsobit i neapoptotický typ programované buněčné smrti, která se nazývá pyroptóza (*Fink and Cookson, 2006*). Myši, které mají poškozenou kaspázu-1 vykazují zvýšenou tvorbu nádorů kolorektálního karcinomu. V tomto případě není mechanismem tvorby nádoru regulace zánětu, ale spíše zvýšená proliferace střevních

epiteliálních buněk v počátečním stádiu vzniku nádoru a snížená apoptóza u pokročilého stádia nádoru (*Hu et al., 2010*).

Myši, s poškozenou kaspázou-1, však mohou mít mutaci i v kaspáze-11. Při zachování aktivity kaspázy-11 prostřednictvím transgenní exprese umělého bakteriálního chromozomu, se současně poškozenou kaspázou-1, dojde k zánětlivé reakci. Tudíž kaspáza-11, spíše než kaspáza-1, je kaspázou, která je zodpovědná za zánět (*Kayagaki et al., 2011*).

2.2 Dvojitá role kaspázy-8

Kaspáza-8 hraje důležitou roli při aktivaci zprostředkované smrtícím receptorem neboli vnější dráze apoptózy. Váže se s FADD a vytváří DISC. Je zajímavé, že u myši při odstranění kaspázy-8, FADD, nebo FLICE inhibičního proteinu (FLIP) regulujícího DISC, dochází ke smrti embryí způsobené různými vadami. Některé z těchto defektů vypadají, jako kdyby byly příbuzné apoptóze. Příkladem je vada vývoje svalů sluchového ústrojí při absenci kaspázy-8 (*Varfolomeev et al., 1998*), porucha vývoje sluchu při absenci FLIP a další vady (*Yeh et al., 2000*). Nicméně tkáňově specifické delece kaspázy-8 odhalily nové funkce této kaspázy, které se zdají být s apoptózou nesouvisející. Funkce kaspázy-8 je rovněž důležitá pro homeostázu T-buněk (*Salmena et al., 2003*) a při zánětu kůže a hojení ran (*Kovalenko et al., 2009; Lee et al., 2009; Li et al., 2010*). Ovšem některé z vad, které vedou k úmrtí embryí, spojených se ztrátou kaspázy-8, nejsou následkem narušení apoptózy, ale spíše defektním potlačením receptorové interakce serin-threonin-kinázy 3 (RIPK3) závislé na nekróze. Zdá se tedy, že kaspáza-8 má dvojitou roli, a to podílet se na aktivaci apoptózy a potlačovat nekrózu (*Kaiser et al., 2011; Oberst et al., 2011; Zhang et al., 2011*).

2.3 Kaspáza-10

Mitochondriální proteiny fungují jako jedny ze základních regulátorů apoptózy. Mitochondriální adenylátkináza 2 (AK2) zprostředkovává mitochondriální apoptózu vytvořením komplexu AK2-FADD-kaspáza-10 (AFAC10). Během apoptózy se AK2 translokuje do cytoplazmy, zatímco je tento proces inhibován v buňkách APAF-1 vlivem proteinu B-buněčného lymfomu 2 (Bcl-2) a velkého proteinu B-buněčného lymfomu (Bcl-XL), které patří k antiapoptotickým proteinům. Přidáním vyčištěného AK2 proteinu do buněčných extraktů, dojde nejdříve k vyvolání aktivace kaspázy-10

prostřednictvím FADD a následně k aktivaci kaspázy-3, ovšem bez ovlivnění kaspázy-8. Komplexy AFAC10 jsou detekovány v buňkách, které podléhají vnitřní cestě buněčné smrti a AK2 podporuje spojení kaspázy-10 s FADD. Studie naznačují, že AK2 působící společně s FADD a kaspázou-10, zprostředkovává novou vlastní apoptotickou dráhu, která se může podílet na tvorbě nádorů (*Lee et al., 2007*).

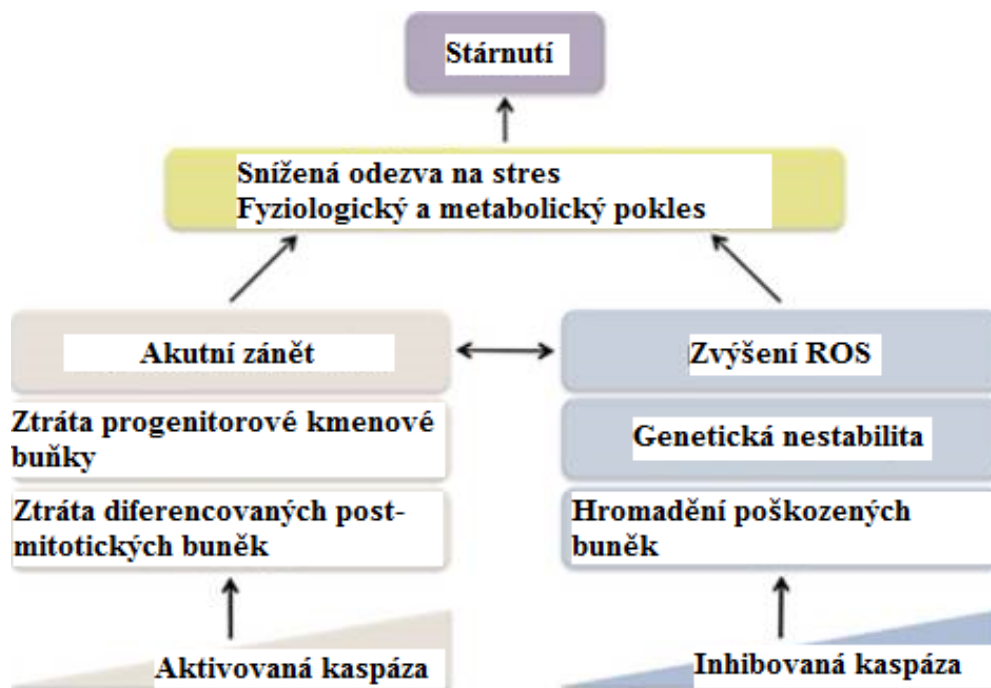
2.4 Kaspáza-12 a její spojitost s apoptózou vyvolanou stresem endoplazmatického retikula

Kaspáza-12 je lokalizovaná v endoplazmatickém retikulu (ER) a zprostředkovává apoptózu pod stresem ER. To hraje klíčovou roli při mnoha onemocněních nervového systému, jako je například Alzheimerova choroba. Stres ER je hlavně vyvolán akumulací bílkovin, především nesbalených nebo neupravených, v lumen ER a/nebo nerovnováhou homeostázy vápenatých iontů. Právě syntéza a skládání proteinů a uvolňování vápenatých iontů patří mezi hlavní funkce ER (*Fan, et al., 2005*).

U některých buněčných typů bylo dokázáno, že stres ER může vést k apoptóze do níž je zapojena kaspáza-12. V apoptóze zprostředkované například tunicamycinem se zpracovává prokaspáza-12 na svém N-konci, což je nezbytné nejen k translokaci aktivní kaspázy-12 do jádra, ale také k vyvolání buněčné apoptózy. Při stresu ER může být aktivace prokaspázy-12 indukována jinými kaspázami. Induktory stresu mohou vést k translokaci kaspázy-7, lokalizované v cytosolu, na povrch ER. Kaspáza-7 aktivuje prokaspázu-12, tím že rozdělí svou prodoménu. Tento způsob aktivace může být použit při prodloužených apoptózách vyvolaných stresem ER (*Rao, et al., 2001*). Funkce mitochondrií se v tomto typu apoptózy různě liší. Prokaspáza-12 je specificky aktivována jako indukční kaspáza při apoptóze spouštěné stresem ER u myoblastické buněčné linie C2C12. Aktivovaná kaspáza-12 poté aktivuje prokaspázu-9 v cytosolických extraktech. Aktivovaná kaspáza-9 dále aktivuje prokaspázu-3, -6 a -7. V těchto nově objevených kaspázových cestách nebylo zjištěno, že by se z mitochondrií uvolňoval cytochrom c, což značí, že cytochrom c není zapojen do aktivace prokaspázy-9. Prokaspáza-9 je tedy substrátem kaspázy-12 (*Morishima, et al., 2002*).

2.5 Spojitost kaspáz a apoptózy s procesy stárnutí

Aktivace kaspázy nastává během procesu stárnutí, což obvykle bývá doprovázeno poklesem tolerance napětí a funkční síly. Tato zvýšená aktivita kaspázy zrychluje stárnutí akutním zánětem. Zvýšená aktivita kaspáz má také za následek odstranění kmenových buněk, zatímco u onemocnění jako je ischemie, způsobuje ztrátu vysoce diferencovaných buněk, například neuronů a kardiomyocytů, což se často může týkat kaspázy-9. Tím dochází k funkčnímu poklesu a redukci regenerační schopnosti. Pokles apoptózy může však také urychlit proces stárnutí, Dochází totiž k zabránění odstraňování poškozených a starých buněk, zvýšení genetické nestability a oxidačního stresu vlivem reaktivních forem kyslíku (ROS) (obr. 4) (Shalini et al., 2015).



Obrázek č. 4: Procesy vedoucí k buněčnému stárnutí.

Reaktivní formy kyslíku - ROS

(Převzato a upraveno z: Shalini et al., 2015).

Stárnutí je popisováno jako proces, při kterém dochází k progresivnímu poklesu funkce jednotlivých orgánů nebo i celého organismu, a který je z velké části způsoben hromaděním poškozených buněk. Od té doby, co byly kaspázy objeveny a apoptóza byla popsána jako složitý mechanismus procesu buněčné smrti, je apoptóza spojována s procesem stárnutí organismu.

Apoptóza je zapojena do procesu stárnutí dvěma způsoby. První způsob spočívá v odstranění nežádoucích buněk nebo buněk s porušenou funkcí z mnohobuněčného organismu, čímž dochází k udržování normální rovnováhy celého organismu. Druhý způsob je založen na odstranění funkčně významných postmitotických buněk, jako jsou neurony nebo kardiomyocyty. Tím však může dojít k urychlení patologických změn souvisejících s řadou onemocnění spojených s procesem stárnutí (*Shalini et al., 2015*).

Zvýšení oxidačního stresu a nízký stupeň zánětu jsou charakteristické pro proces stárnutí, spojeného s aktivitou kaspázy-1 (*Salminen et al., 2012*). V jiných studiích bylo pozorováno, že po aplikaci inhibitoru kaspázy-1 do mozkové komory potkanů dojde ke zlepšení jejich paměti. Ze závěru studie tedy vyplývá, že inhibice kaspázy-1 může zpomalit patologické stavy spojené s procesem stárnutí (*Gemma et al., 2005*). Ztráta svalové hmoty související s věkem, nazývaná jako sarkopenie, je spojena se sníženou diferenciací kmenových buněk, které jsou také označovány jako satelitní buňky (SC), do myofibril. Ve studii, která se zabývala porovnáním aktivity kaspáz u mladých a starších jedinců, byla pozorována zvýšená rychlost apoptózy a zvýšená aktivita kaspázy-2, -6, -7 a -9, a to u starších SC, což svědčí o zvýšené náchylnosti lidských SC starších jedinců k podstupování apoptózy. Tím dochází ke snižování buněčných populací kmenových buněk, což má za následek zvýšenou ztrátu nebo až poškození svalové hmoty (*Fulle et al., 2013*).

2.6 Role kaspáz při tvorbě nádorů

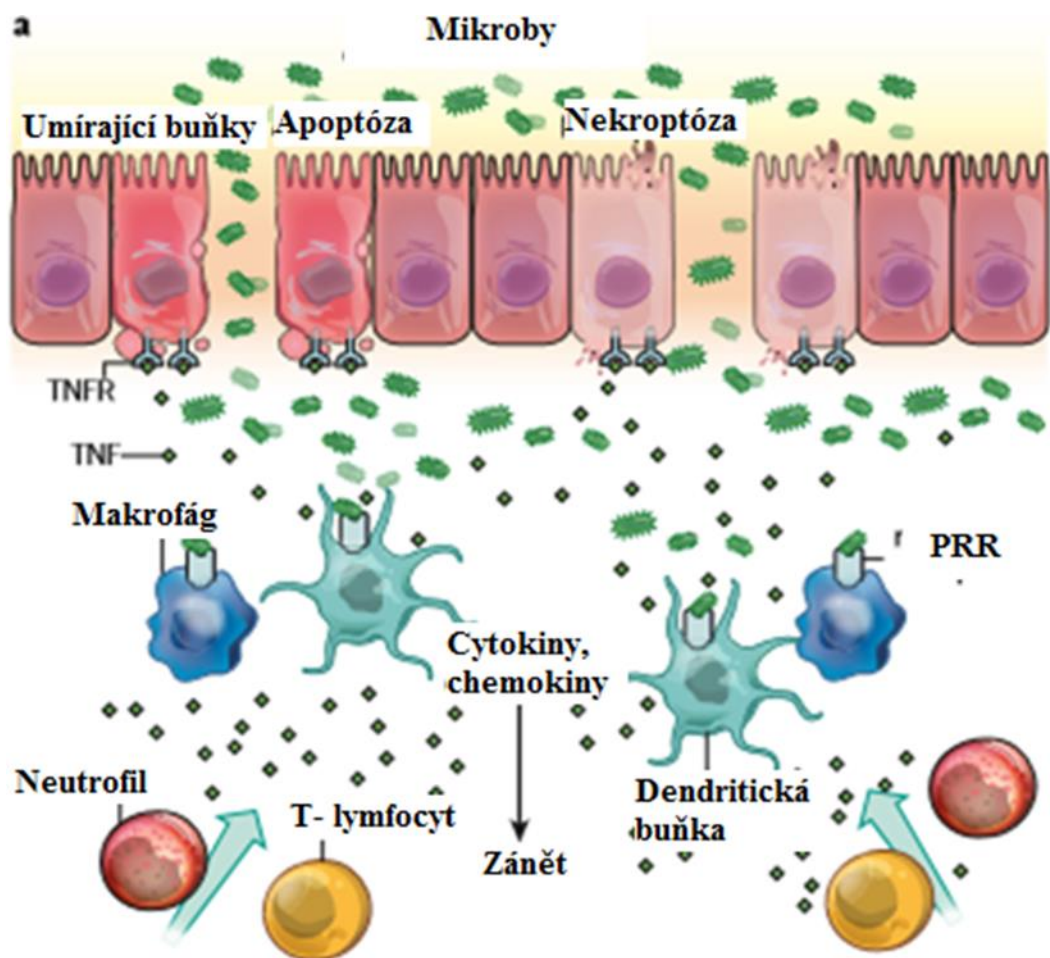
Kaspázy mohou být aktivovány v nádorech různými cestami. Například během růstu nádoru dochází ke spouštění apoptózy v maligních buňkách, přičemž cílem je potlačení růstu nádoru a snaha zastavit onkogenní bujení (*Menéndez et al., 2010*). Terapie na léčbu rakoviny jsou často vyvíjeny tak, aby vyvolávaly buněčnou smrt nádorových buněk, proto může být aktivace kaspázy považována za žádoucí výsledek. V posledních letech byla odhalena neočekávaná negativní vlastnost kaspáz, a to, že by mohly být zapojeny do podpory vzniku nádorů. Vysoká hladina aktivity kaspázy v nádorových buňkách byla spojena se špatnou prognózou u pacientů trpících rakovinou (*Jäger et al., 2010*). Kaspázy podílející se na apoptóze řídí nejen proliferaci nádorů a dělení buněk, ale ovlivňují i maligní změny, jako je například tvorba metastáz, angiogeneze, koordinovaný růst a akumulace nádorově asociovaných makrofágů (*Ford et al., 2015*).

Kaspázou vyvolaná mitogenní signalizace při tvorbě nádorů naznačuje souvislost s hojením a regenerací ran. Nádory jsou definovány jako rány, které se nikdy nehojí (Dvorak, 2015). Tento poznatek se týká podobnosti ran a nádorů, jako je vaskulární a stromální modifikace, záněty a angiogeneze. Kaspázou zprostředkovaná tvorba mitogenních signálů, která je výhodná pro stimulaci regeneračních procesů, může být inhibována nádory za tvorby onkogenního růstu. Proto je zajímavé, že některé tkáně, které mají prospěch z apoptotické signalizace pro regeneraci, jsou více náchylné na růst nádoru vyvolaného kaspázou (Patel et al., 2015). Růst nádoru může být řízen i signálem, který je zprostředkován kaspázou z okolních buněk. Tyto buňky mohou být jiného buněčného typu, než je samotný nádor. Například umírající endotelové buňky mohou podporovat proliferaci buněčných linií gliomu. Tento účinek je zprostředkován kaspázou-3 (Mao et al., 2013).

3. Nekróza

Nekróza je typem buněčné smrti vyplývajícím z poruch prostředí. Často je doprovázena nekontrolovatelným uvolňováním buněčného obsahu, čímž dochází k vyvolání zánětlivé reakce v místě, kde nekrotická buněčná smrt proběhla (*Fink and Cookson, 2005*) (obr. 5). Jedná se o nevratné poškození buněk v důsledku styku se škodlivými podněty, které vedou téměř vždy ke smrti buněk (obr. 3). Škodlivými podněty mohou být bakterie, viry, plísně, paraziti, hypoxie nebo extrémní podmínky jako je teplo, či různé druhy záření včetně ultrafialového. Buňky podstupující nekrózu vykazují dva hlavní typy mikroskopického nebo makroskopického vzhledu. Prvním typem je „tekutá nekróza“, která je také nazývána jako kolikvační. Pro tu je charakteristické částečné nebo úplné rozpouštění mrtvé tkáně a transformace na kapalnou viskózní hmotu, což je dáno aktivitou hydrolytických enzymů, které způsobují rozpouštění buněčných organel. Enzymy zodpovědné za zkapalňování pocházejí z bakteriálních hydrolytických enzymů nebo z lysozomálních hydrolytických enzymů. Při kolikvační nekróze také dochází ke ztrátě buněčného profilu. Druhým hlavním typem je koagulační nekróza, pro kterou je typické, že si zachovává normální architekturu nekrotické tkáně i několik dní po smrti buněk (*Adigun and Bhimji, 2017*).

Některé studie naznačují, že i výskyt nekrózy je přísně regulován. Nekróza může zahrnovat i procesy jako je mitochondriální dysfunkce, zvýšená tvorba reaktivních kyslíkových sloučenin, deplece ATP, proteolýza kalpainů a katepsinů a raná ruptura plazmatické membrány. Kromě toho inhibice specifických proteinů podílejících se na regulaci apoptózy nebo autofagie může změnit typ buněčné smrti právě na nekrózu. Nekrotická buněčná smrt je často asociována s ischemií, traumaty a některými formami neurodegenerativních onemocnění (*Golstein and Kroemer, 2007*).



Obrázek č. 5: Vyvolání zánětu vlivem regulované buněčné smrti, Receptor rozpoznávající vzor - PRR, Faktor nádorové nekrózy - TNF, Receptor pro nekrotický nádorový faktor - TNFR

(Převzato a upraveno z: Pasparakis and Vandenabeele, 2015).

3.1 Role kaspáz při nekróze

Inhibice aktivity kaspázy vyvolává přechod od apoptózy k nekróze. Inhibitory apoptózy zcela zabraňují spontánní apoptóze a inhibují peptidázovou aktivitu lidského apoptotického proteinu CPP32/kaspáza-3 vykazovanou apoptotickými buňkami. Potlačení apoptózy však není spojeno s dlouhodobým zvýšením přežívání buněk, ale naopak s přechodem od apoptotické smrti k nekrotické formě smrti, což naznačuje, že apoptóza a nekróza mají společné iniciační dráhy (Lemaire et al., 1998).

Buňky myšního fibrosarkomu L929 ošetřené faktorem nádorové nekrózy (TNF) podléhají rychle nekróze v důsledku nadměrné tvorby reaktivních kyslíkových meziproduktů. Když byl modifikátor A cytokinové odpovědi (CrmA), což je inhibitor

virového původu kaspázového typu, nadměrně exprimován v buňkách fibrosarkomu, tak se stal 1000krát citlivější na buněčnou smrt zprostředkovanou TNF. Zvýšená citlivost TNF, byla pozorována, pokud byly buňky předběžně ošetřeny inhibitorem kaspázy-1 nebo kaspázy-3. Dva širokospektré inhibitory tvořily navíc buňky citlivější. Přítomnost jednoho z inhibitorů také vedla k rychlejšímu zvýšení produkce kyslíkových radikálů zprostředkovaných TNF. Tyto výsledky naznačují zapojení kaspáz do ochrany před TNF- indukovanou tvorbou kyslíkových radikálů a nekrózou (*Vercammen et al., 1998*).

4. Další formy buněčné smrti

Regulovaná, programovaná buněčná smrt je zásadní pro všechny mnohobuněčné organizmy. Nejlépe prostudovanou formou programované buněčné smrti je apoptóza (Tait *et al.*, 2014), která byla popsána již v předchozích kapitolách, stejně tak jako nekróza (Adigun and Bhimji, 2017). V posledních letech bylo objeveno, že existují i jiné, neapoptotické formy buněčné smrti, jako je pyroptóza a nekroptóza. Tyto neapoptotické způsoby buněčné smrti mohou být spuštěny nezávisle na apoptóze nebo pokud by apoptóza selhala. Dále byly objeveny další, atypické formy buněčné smrti, mezi které patří autofagie a autofagická buněčná smrt, buněčná smrt nezávislá na kaspázách (Tait *et al.*, 2014), onkóza, mitotická katastrofa, entóza, anoikis, excitotoxicita, paraptóza, pyronekróza, kornifikace a Wallerianská degenerace (Kroemer *et al.*, 2009).

4.1 Pyroptóza

Pyroptóza je prozánětlivá forma regulované buněčné smrti, která se spoléhá na enzymatickou aktivitu zánětlivých proteáz, které patří do aspartát-specifických cysteinových proteáz, jsou tedy řazeny mezi kaspázy. Termín pyroptóza, byl poprvé použit v roce 2001, a je odvozen z řeckého slova *pyroptosis*, přičemž kořen slova *pyro-*, se vztahuje k horečce nebo ohni, a koncovka *-ptosis*, označuje pád. Celé označení tak vystihuje zánětlivou povahu této formy buněčné smrti (Vande Walle and Lamkanfi, 2016), která je dána aktivací kaspázy-1. Kaspáza-1 byla však původně objevena jako interleukin-1 beta- konvertující enzym a v rámci tzv. inflamazómu vede k uvolňování prozánětlivých cytokinů, interleukinu-1 (IL-1) a interleukinu-18 (IL-18) (Brough and Rothwell, 2007).

Buňky podstupující pyroptózu mají některé znaky společné s apoptotickými buňkami, přestože apoptóza není spojena s lýzou, tedy rozkladem buněk a je obecně považována za imunologicky tichou. Barvení annexinem-V, fragmentace DNA, kondenzace chromatinu, aktivace kaspázy-3 a -7 a štěpení poly (ADP-ribózy) polymerázy 1 (PARP1) jsou považovány za typické znaky apoptózy. Tyto projevy však nemusejí být nutně biomarkery selektivní vůči apoptóze (Vande Walle and Lamkanfi, 2016). Pyroptóza může být vyvolána i mikrobiálními infekcemi, byla například pozorována u makrofágů, infikovaných *Salmonella typhimurium*, dále ji mohou vyvolávat i neinfekční stimuly, jako jsou látky produkované během infarktu myokardu

(Frantz *et al.*, 2003). Apoptotické buňky jsou pozitivní na annexin-V, protože kaspázou zprostředkovaná inaktivace fosfatidylserinu (PS) flipázy a souběžná aktivace fosfolipidové skramblázy podporují časnou a aktivní translokaci PS na vnější straně plazmatické membrány. Dochází tak k prasknutí membrány pyroptotických buněk, a díky tomu k odhalení vnitřní části plazmatické membrány. V důsledku toho pak může dojít k vazbě annexinu-V na PS vnitřní strany plazmatické membrány. Předpokládá se také, že pyroptóza je doprovázena tvorbou pórů v plazmatické membráně, závislých na aktivitě kaspázy-1, které jsou velké 1 až 2 nm. Póry vedou k transmembránovému toku iontů, cytoplazmatickému otoku a nakonec osmotické lýze buňky. Právě tyto póry umožňují molekulám s malou molekulovou hmotností, jako je propidium jodid (PI), aby snadno vstoupily a zabarvily pyroptotické buňky. Barvení annexinem-V tedy neumožňuje rozlišovat mezi apoptotickou a pyroptotickou buněčnou smrtí, ale kombinované barvení s annexinem-V a PI může být použito k rozlišení mezi těmito různě regulovanými procesy buněčné smrti (Vande Walle and Lamkanfi, 2016).

4.1.1 Role kaspáz při tvorbě inflamazómů

Pyroptóza je typická pro „profesionální“ fagocyty myeloidní linie, mezi které se řadí makrofágy, dendritické buňky a neutrofilny, byla ovšem pozorována také u T-lymfocytů, kožních buněk, epitelálních buněk, endotelálních buněk a neuronů. Jedním z vysvětlení může být vyšší hladina kaspáz u těchto typů buněk. To se týká zejména kaspáz podílejících se na zánětu, jako jsou kaspázy-1 a -11 u myši a kaspázy-1, -4 a -5 u lidí. Kaspáza-1 je syntetizována jako inertní cytosolový zymogen, který se stává aktivním po jeho náboru do inflamazómů (Vande Walle and Lamkanfi, 2016), což je skupina cytosolických multiproteinových komplexů (Franchi *et al.*, 2012). Tvorba inflamazómů vyžaduje jako senzor specifické receptory rozpoznávající vzory (PRR). Tyto receptory mají velmi rozmanitou roli v imunitním systému, detekují unikátní mikrobiální struktury, mikrobiální nukleové kyseliny, složky mikrobiální buněčné stěny a další látky. PRR mohou být děleny do dvou skupin, dle jejich subcelulární lokalizace. Do první skupiny patří receptory podobné genu „Toll“ (TLR) a lektinové receptory typu C (CLR), ty jsou uloženy v plazmatické membráně a endozomech. Do druhé skupiny patří receptory podobné genu „Nod“ (NLR), receptory podobné kyselině retinové (RLR) a senzor chybějící v melanomu 2 (AIM2) (Takeuchi and Akira, 2010).

Za účelem zahájení zánětu a obrany dojde k tomu, že se inflamazomy spojují, dále dochází k aktivaci prokaspázy-1 na kaspázu-1, uvolnění IL-1 a IL-18 a vyvolání pyroptózy (obr. 3). Kaspáza-1 a lidské kaspázy-4 a -5 také způsobují pyroptotickou buněčnou smrt makrofágů, které jsou infikovány vakuolárními Gram-negativními bakteriemi. Rozklad patogenů obsahujících vakuoly je zprostředkován guanylát vázajícím proteinem (GBP), který umožňuje vstup lipopolysacharidu (LPS) do cytoplazmy. Cytoplazma se přímo váže k doméně CARD kaspázy-11, ta spouští její oligomeraci a aktivaci. Vyvolání pyroptózy prostřednictvím LPS je podporováno kaspázou-11, u lidí kaspázou-4 a -5, bez nutnosti přítomnosti kaspázy-1. Kaspáza-11 nicméně zapojuje Nlrp3 inflamazóm k podpoře produkce cytokinů závislých na kaspáze-1, jelikož samotná kaspáza-11 není schopná přímo podporovat zrání IL-1 β a IL-18. Tato cesta bývá právě proto označována jako „non-kanonická“ Nlrp3 inflamazómová dráha (*Vande Walle and Lamkanfi, 2016*).

4.2 Nekroptóza

Nekroptóza, bývá označována jako specializovaná cesta programované nekrózy (*Galluzzi and Kroemer, 2008*). Několik důkazů naznačuje, že nekróza může být programovaným procesem a pokud tomu tak je, tak ji tedy můžeme označovat jako nekroptózu. Mezi důkazy patří, že nekróza může být regulována genetickými, epigenetickými a farmakologickými faktory, může být indukována ligandy, které se vážou na specifické plazmatické membránové receptory a dále nekrotická buněčná smrt může přispět ke správnému vývoji embrya a udržování homeostázy ve tkáních dospělého jedince (*Golstein and Kroemer, 2007*). Inaktivace kaspáz, může kromě toho způsobovat i posun od apoptózy buď k morfologii buněčné smrti, která má smíšené nekrotické a apoptotické vlastnosti nebo k plnohodnotné nekróze (*Kroemer et al., 2009*).

Termín nekroptóza je v posledních letech užíván k označování konkrétního jednoho typu programované nekrózy závislé na aktivitě receptorové interakce serin-threonin-kináza 1 (RIP1) (*Kroemer et al., 2009*). RIP1 může podporovat přechod mitochondriální propustnosti závislé na komplexu s přechodnou pórovitou permeabilitou (PTPC) (*Golstein and Kroemer, 2007*). Propustnost mitochondriální membrány přispívá ke smrti buněk. Může být odvozena z přechodu mitochondriální propustnosti, který nejdříve ovlivňuje vnitřní mitochondriální membránu,

nebo z propustnosti vnější mitochondriální membrány, která je zprostředkována proapoptotickými proteiny Bcl-2 (Kroemer *et al.*, 2007). Myší fibrosarkomové buňky L929 podstupující nekroptózu nemají prostupnou vnější mitochondriální membránu (Golstein and Kroemer, 2007). Nekroptóza je také spojena s rychlou poruchou mitochondriální funkce, čímž dochází ke zvýšené tvorbě ROS. Mitochondriální dysfunkce způsobí pokles intracelulárního ATP. Celý tento proces může vyvrcholit bioenergetickou krizí, která může představovat konečný krok nekroptózy (Galluzzi and Kroemer, 2008).

4.2.1 Spojitost mezi nekroptózou a apoptózou

Programovaná buněčná smrt je důležitá pro správný vývoj a udržování imunitního systému a jeho reakce na podněty z vnitřního i vnějšího prostředí. Apoptóza a nekroptóza jsou hlavní cesty programované buněčné smrti, které jsou důležité při vývoji. (Han *et al.*, 2011). Tyto dvě programované buněčné smrti mohou nastat současně (Zhang *et al.*, 2015) nebo se mohou navzájem potlačovat. Nekroptóza může také sloužit jako alternativa, pokud je apoptóza z nějakého důvodu blokována a tudíž nemůže probíhat (Han *et al.*, 2011). Nejpodrobněji charakterizovaná dráha, která vede k nekroptóze je zahajována zapojením TNFR1. V závislosti na typu buňky, aktivačním stavu buňky a různých faktorech mikroprostředí může TNF vést buď k přežití buňky, k apoptóze nebo k nekroptóze. O tom, kterou cestou se proces bude ubírat, rozhoduje složitá síť signálů, které mohou přepínat mezi odlišnými typy odpovědí (Wilson *et al.*, 2009).

Regulovaná buněčná smrt vyvolává zánět, protože při odumírání epiteliálních buněk ve tkáních tvořících bariéry může docházet k narušení právě těchto bariér, což umožní komenzálním, ale i jiným mikrobům napadnout tkáň. Rozpoznání molekulárních vzorů spojených s mikrobiálními patogeny pomocí PRR na myeloidních buňkách nebo buňkách pojivové tkáně, vyvolává produkci cytokinů a chemokinů, které aktivují a přitahují imunitní buňky. Cytokiny mohou vyvolat odumírání dalších epiteliálních buněk, čímž může dojít ke vzniku chronického zánětu. Stále však není zcela jasné, zda apoptóza a nekroptóza mají stejnou schopnost vyvolat poškození tkáně (obr. 5) (Pasparakis and Vandenabeele, 2015).

4.2.2 Role kaspázy v nekroptóze

Jednou z funkcí kaspázy-8 je regulace nekroptózy ve střevním epitelu a koncové části tenkého střeva. U myší, kterým chyběla právě kaspáza-8, docházelo samovolně k zánětlivému poškození tkáně střevního epitelu a byly více náchylné k zánětům trávicí trubice. Dále neměly Panethovy buňky a měly i snížený počet pohárkových buněk, což doprovází poruchu funkce antimikrobiálních buněk nacházejících se v intestinálním ileu, které zodpovídají za imunitní funkci. Docházelo i ke zvýšené buněčné smrti v oblasti krypt tenkého střeva, kde se běžně vyskytují Panethovy buňky. Odumírání epiteliálních buněk bylo vyvoláno vlivem TNF- α , dále bylo spojeno se zvýšenou expresí RIP3, k její inhibici může dojít při procesech, kdy dochází k zabránění nekroptózy. Vysoká hodnota RIP3 byla zjištěna v lidských Panethových buňkách a podporovala nekroptózu v koncové části tenkého střeva, neboli terminálním ileu, u jedinců trpících Crohnovou chorobou. To naznačuje možný negativní vliv nekroptózy v patogenezi některých onemocnění a v regulaci střevní homeostázy (Günther et al., 2011).

Nekroptóza zprostředkovaná pomocí RIP může být inhibována jak *in vivo*, tak i *in vitro* a to vlivem nekrostatinu-1, který se používá jako selektivní inhibitor malých molekul RIP1 kinázy, která je spojená s receptorem domény smrti (Degterev et al., 2008). Při kultivaci malých střevních organoidů *in vitro* od myší, kterým chyběla kaspáza-8, docházelo k nekróze během 24 hodin po přidání TNF- α , na rozdíl od srovnávacích, kontrolních myší, kterým kaspáza-8 nechyběla. Léčba nekrostatinem-1 snížila úmrtnost způsobenou TNF- α a poškození tenkého střeva u myší s deficitem kaspázy-8. Stejně tak, pokud byla buněčná kultura předem ošetřena nekrostatinem-1, tak nedocházelo k nekróze střevních organoidů. Z toho lze vyvodit závěr, že nedostatečná exprese kaspázy-8 vede k riziku nekroptózy Panethových buněk vyvolané TNF- α (Günther et al., 2011).

4.3 Autofagie

Označení autofagie, někdy také buněčné „samonatravení“ (Mizushima et al., 2008) se používá pro programovaný katabolický proces, který je spojen s transportem složek cytoplazmy do lysozomu (Anding and Baehrecke, 2015; Ravikumar et al., 2010). V nich následně dochází k lýze těchto složek. Autofagie tedy představuje rozklad vlastních buněčných složek v autofagických vakuolách umírajících buněk.

Pro morfologickou charakteristiku je typická vakuolizace, degradace cytoplazmatického obsahu a kondenzace chromatinu (*Fink and Cookson, 2005*) (obr. 3). Termín autofagie byl poprvé použit Christianem de Duve v roce 1963 k popisu jevu spojeného s jedno- nebo dvojitou cytoplazmatickou membránou, která obsahovala organely, v různých stupních „samonatravení“. Tento typ autofagie je také nazýván makroautofagie, dále rozlišujeme mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperonem (*Ravikumar et al., 2010*).

Autofagie probíhá u savčích buněk za bazálních podmínek a může být vyvolána stresem ER, oxidačním stresem, nedostatečným zásobením buněk, farmakologickou léčbou nebo různými patologickými stavy. Podílí se na udržování buněčné homeostázy uvolňováním živin z makromolekul a na odstraňování chybně složených proteinů, poškozených organel a patogenních bakterií. Proto může porucha funkce autofagické dráhy stát za zvyšujícím se počtem lidských infekčních, nádorových a neurodegenerativních onemocnění (*Mizushima et al., 2008*).

Během autofagie dochází k prodlužování preautozomálních struktur označovaných také jako fagofory, dále dochází k pohlcení části cytoplazmy do nitra měchýřků s dvojitou membránou, nazývaných jako autofagozomy. Autofagozomy nejprve splývají s endozomem za vzniku amfizomů, které se poté spojují s kyselými lysozomy, kde dochází ke konečnému rozkladu obsahu cytosolu (*Ravikumar et al., 2010*).

4.3.1 Spojitost mezi autofagií a jinými typy buněčné smrti

Apoptotická a autofagická buněčná smrt mohou společně existovat ve stejných buňkách a buněčná smrt tak může vykazovat smíšené charakteristiky i na molekulární úrovni. Buněčná odezva na stejné podněty se může projevit převážně autofagickými nebo apoptotickými vlastnostmi. V některých systémech může apoptóza a autofagie záviset navzájem na sobě, takže blokování jednoho typu buněčné smrti může ovlivnit typ druhý. V jiných situacích může jeden mechanismus buněčné smrti působit proti druhému, nebo se mohou zvláštním způsobem projevit společně. Z čehož lze vyvodit, že inhibice jednoho typu buněčné smrti může potencovat nebo taktéž inhibovat druhý typ buněčné smrti (*Gozuacik and Kimchi, 2007*).

Zatím je jen velmi málo důkazů, jak může autofagie souviset s nekrózou a nekroptózou (*Yu et al., 2004*). Některé studie ovšem naznačují, že autofagie může

ovlivnit osud buněk, které jsou ošetřeny látkami vyvolávajícími nekroptózu (*Fitzwalter and Thorburn, 2015*).

4.3.2 Role kaspáz v autofagii

Kaspáza-2 může hrát velmi významnou roli v neapoptotické formě buněčné smrti a to zejména jako negativní regulátor autofagie. Právě regulace ROS, která je zprostředkovaná kaspázou-2 má významnou funkci v ovlivňování autofagie (*Tiwari et al., 2014*).

Kaspáza-8 má také významnou roli v souvislosti se spojením procesů apoptózy a autofagie. Kaspáza-8 je i přes její velmi nízkou hladinu schopna inhibovat autofagii. Jak ovšem kaspáza-8 vyvolává inhibici autofagické signální dráhy není dosud zcela známo, je však pravděpodobné, že se jedná o signalizaci pomocí RIP, která je nezbytná pro autofagickou buněčnou smrt (*Yu et al., 2004*). RIP je inaktivován a štěpen vlivem kaspázy-8, což působí jako prevence proti autofagické smrti buněk a to tak, že inhibicí kaspázy-8 je umožněno RIP přenášet signál, jež je potřeba k vyvolání smrti buňky. Jak je generována aktivní kaspáza-8 v nepřítomnosti signálního komplexu indukujícího smrt, není taktéž ještě zcela známo, ale je jisté, že vstupuje do nového signalizačního komplexu (*Lee et al., 2003*).

4.4 Onkóza

Termín onkóza je odvozen z řeckého slova bobtnání. Poprvé byl použit před více než sto lety, avšak proces této buněčné smrti nebyl tehdy důkladně popsán, protože v té době ještě neexistovala vyspělá technika pro přípravu tkáňových řezů. To bylo důvodem, proč byl tento děj na nějakou dobu zcela opomíjen (*Weerasinghe et al., 2018*). Onkóza byla dlouhou dobu považována za neřízenou buněčnou katastrofu. Byla přirovnávána k balónku, který je nafouknut nad jeho maximální kapacitu a praskne (*Liu et al., 2004*).

Onkóza může ovlivňovat také okolní buňky. K častým projevům patří rozšíření ER, „krvácení“ plazmatické membrány, mitochondriální otok a shlukování jaderného chromatinu. Dále dojde ke stálému zvyšování propustnosti plazmatické membrány, což je následováno rozpadem membrány, uvolněním zánětlivých nitrobuněčných složek a vznikem zánětu (obr. 5). Onkóza se může vyskytovat u řady onemocnění, jako jsou selhání jater a ledvin, nebo onemocnění srdce. Se zvyšujícím se počtem buněk, které

podstupují onkózu se zvyšuje i riziko poškození funkce orgánů, ke kterému může přispět i uvolněný nitrobuněčný obsah (*Liu et al., 2004*). Typicky se může vyskytovat při infarktu a po prodělané tkáňové ischemii. Ischemii však mohou vyvolávat i jiné typy buněčné smrti. Onkóza může být vyvolána i poruchou mitochondriální funkce nebo velmi vysokou spotřebou energie ATP (*Schaeffer et al., 2010*). Přesné pochopení procesu onkotické buněčné smrti v jednotlivých typech tkání je velmi důležité pro rozvoj inhibitorů a tedy možnosti jejího blokování, a tím i eventuálního zabránění rozvoje některých těchto onemocnění (*Liu et al., 2004*).

4.4.1 Role kaspáz při onkóze a její souvislost s jinými typy buněčné smrti

V roce 2005 bylo popsáno, že onkóza je závislá na kaspáze-1. Dále bylo dokázáno, že smrt nádorových buněk prostřednictvím onkózy je závislá na Bcl-2, ale zároveň nezávislá na kaspáze-3 (*Weerasinghe and Buja, 2012*). Kaspáza-1, je však více typická pro programované buněčné smrti, hlavně pro pyroptózu, než pro onkotickou buněčnou smrt (*Miao et al., 2011; Fink and Cookson., 2005*). Všeobecně je ale onkóza považována za jednu z velmi důležitých neapoptotických (*Weerasinghe and Buja, 2012*), neprogramovaných nebo také náhodných, na kaspázách nezávislých buněčných smrtí (*Miao, et al., 2011*).

Stejně jako pyroptóza se i onkóza řadí mezi zánětlivé buněčné smrti, protože dochází u obou těchto typů buněčné smrti k lýze, tedy rozpadu buňky a uvolnění cytosolického obsahu do vnějšího okolí buňky, čímž dojde k vyvolání zánětu. Podobně jako apoptóza, tak i onkóza může postihovat všechny typy buněk (*Miao et al., 2011*). Onkotická buněčná smrt má téměř všechny projevy opačné než apoptóza. Při apoptóze dochází ke smršťování buněk bez porušení plazmatické membrány, zatímco u onkózy dochází naopak k jejich otoku, včetně otoku organel, bobtnání a zvýšené propustnosti plazmatické membrány. Při onkóze také často dochází ke vzniku zánětu v okolí buňky, zatímco u apoptózy nikoliv (*Weerasinghe et al., 2018; Balvan et al., 2015*).

5. Na kaspázách nezávislá buněčná smrt

Buněčná smrt nezávislá na kaspázách je definována jako smrt, která následuje, pokud signál, který za normálních podmínek vyvolává apoptózu, nedokáže aktivovat kaspázy. I přesto, má ale buněčná smrt nezávislá na kaspázách některé charakteristiky společné s apoptotickou buněčnou smrtí, jako je např. prostupnost vnější mitochondriální membrány. Procesy, závislé na kaspázách, jako je přenesení PS na vnější stranu a kondenzace chromatinu, v průběhu buněčné smrti nezávislé na kaspázách zcela chybí. Buňky, které nejsou závislé na kaspázách často vykazují rozsáhlou cytoplazmatickou vakuolizaci, hromadění autofagozomů a kondenzaci jader na periférii. Průběh buněčné smrti nezávislé na kaspázách je obecně mnohem pomalejší, než je průběh apoptotické buněčné smrti. Apoptotické buňky mají relativně neměnné pozorovatelné vlastnosti a znaky, ale buňky podstupující buněčnou smrt nezávislou na kaspázách mohou vykazovat velmi rozdílné charakteristiky, které jsou závislé na faktorech, jako jsou počáteční vyvolávající podnět, typ buňky a další faktory (*Ekert, et al., 2004*).

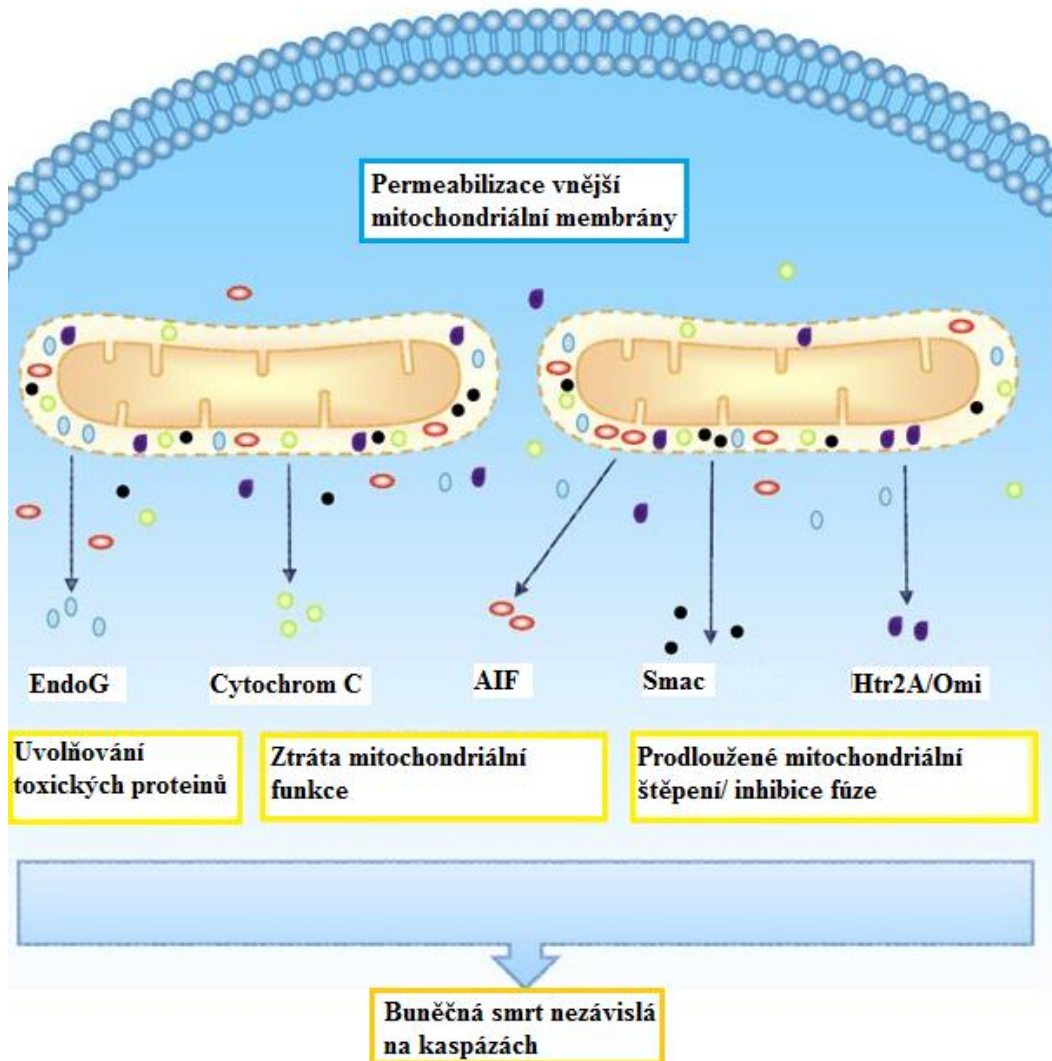
5.1 Aktivace buněčné smrti nezávislé na kaspázách

Jedním ze způsobů aktivace buněčné smrti nezávislé na kaspázách může být prostupnost mitochondriální membrány neboli permeabilizace. Po permeabilizaci vnější mitochondriální membrány se do cytoplazmy uvolňují různé proteiny, pocházející z mezimembránového prostoru. Patří mezi ně například druhý aktivátor kaspáz odvozený od mitochondrií (Smac), serin peptidáza 2 (HtrA2/Omi) a cytochrom c. Dále apoptózu indukující faktor (AIF) a endonukleáza G (endoG), ty však mohou danou buňku aktivně usmrtit způsobem nezávislým na kaspáze. Mitochondriální funkce po proběhlé permeabilizaci vnější membrány postupem času klesají. Poškození těchto funkcí zahrnuje ztrátu možného importu mitochondriálního proteinu a to v důsledku štěpení specifického komplexu proteinů vnitřní mitochondriální membrány a rozklad cytochromu c. Tyto procesy společně postupně vedou ke ztrátě funkce dýchacích řetězců a snížení potenciálu mitochondriální membrány. Současně se aktivuje štěpení mitochondrií a inaktivuje se fúze, čímž se narušuje morfologie mitochondrií. Tento celý proces vede k bioenergetické krizi, která vyvrcholí buněčnou smrtí. A právě tento typ buněčné smrti není závislý na kaspázách (obr. 6) (*Tait et al., 2014*).

Při chybění aktivity kaspáz může být buněčná smrt, a to konkrétně nekroptóza, vyvolána pomocí smrtícího receptoru. Při zablokování aktivity kaspáz, dochází právě k aktivaci smrtícího receptoru, který může řídit nekroptózu prostřednictvím zvýšení aktivity fosfolipázy, která zase zvýší produkci oxidačního stresu. RIP1 kináza je také aktivována nekroptózou, nebo ovlivňováním autofagické buněčné smrti (*Tait et al., 2008*). Virové infekce, poškození DNA a další podněty vedou k aktivaci RIP3 kinázy, čímž dochází k oligomerizaci a fosforylaci některých kináz. Dále dochází k produkci ROS. Po fosforylaci, oligomerizaci a přestavbě plazmatické membrány dochází k rozpadu buňky (*Tait et al., 2014*).

U některých buněk byly prokázány typické apoptotické morfologické znaky, jako jsou fragmentace DNA, kondenzace chromatinu a pyknotické jádro, neboli jádro, které má zahuštěný chromatin. K těmto dějům ovšem došlo v nepřítomnosti aktivace kaspázy, což nasvědčuje, že i apoptóza může být aktivována nezávisle na kaspázách (*Constantinou et al., 2009*). Nezávisle na kaspázách může být pravděpodobně aktivována i neapoptotická, neprogramovaná onkotická buněčná smrt (*Weerasinghe and Buja, 2012; Miao et al., 2011*).

Není však stále zcela jasné, zda se buňky mohou z buněčné smrti nezávislé na kaspázách zotavit. Celá problematika závisí na mitochondriích, které hrají zásadní roli v aktivaci na kaspázách nezávislé buněčné smrti. Existují dvě možnosti, přičemž obě souvisejí právě s mitochondriemi. První možností je, že mitochondrie, které mají prostupné vnější mitochondriální membrány, mohou být regenerovány, čímž dojde ke znovu uzavření vnější membrány a nedojde tedy k rozpadu buňky. Druhou možností je, že některé mitochondrie vůbec nepodstoupí permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (*Yu et al., 2008*).



Obrázek č. 6: Role mitochondrií v průběhu buněčné smrti nezávislé na kaspázách, Endonukleáza G - EndoG, Apoptózu indukující faktor - AIF, Druhý aktivátor kaspáz odvozený od mitochondrií - Smac, Serin peptidáza 2 - HtrA2/Omi.
(Převzato a upraveno z: Tait et al., 2008).

5.2 Parthanatos

Parthanatos je jedna z jedinečných forem buněčné smrti, která nevyžaduje zprostředkování pomocí kaspáz, je tedy nezávislá na aktivaci pomocí kaspáz. Průběh této buněčné smrti je závislý na jaderné přestavbě mitochondriálního AIF. Někdy je také považována za podskupinu nekroptózy, ale obecně je považována za samostatnou kategorii buněčné smrti. Její molekulární mechanismy jsou jedinečné, proto je poměrně hodně odlišná od jiných typů buněčných smrtí. K parthanatos dochází prostřednictvím

nadměrné aktivace jaderného enzymu poly (ADP- ribóza) polymeráza (PARP-1) (Fatokun et al., 2014). PARP-1 hraje důležitou roli nejen v parthanatos, ale také ve spoustě onemocnění. Úloha PARP-1 byla prokázána i při poruše funkce endotelů, zvýšené propustnosti plicního a střevního epitelu a poškození srdeční svaloviny. Nakonec může dojít až k selhání orgánů (Gero and Szabo, 2008). Inhibitory PARP-1 by mohly být účinné v terapeutické oblasti těchto onemocnění (Fatokun et al., 2014).

Průběh parthanatos zahrnuje více kroků a typicky probíhá v neuronech. Při zvýšeném přítoku vápníku dochází k aktivaci neuronální syntázy oxidu dusnatého, která je závislá na vápníku a produkuje oxid dusnatý. Ten může vyvolávat poškození molekul DNA přímo, nebo reagovat se superoxidem a teprve potom dochází k silnému poškození DNA. Podněty, které mohou vyvolat poškození DNA přímo, jsou ROS, peroxid vodíku, alkylační činidla nebo ultrafialové a ionizující záření. Poškození DNA vyvolá nadměrnou produkci PARP-1, která vede k tvorbě a akumulaci jejího polymeru. Tento polymer se váže na vazebné místo AIF, což vede k jeho uvolnění z mitochondrií a přesunu do jádra. V jádře způsobuje vysokou fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu. Celý tento soubor dějů je zakončen smrtí buňky (Fatokun et al., 2014).

6. Detekce aktivity kaspáz *in vitro*

Jedním z prvních znaků apoptózy je aktivace kaspáz. Jedná se o nevratný děj, protože proteolyticky inaktivované molekuly mohou být obnoveny pouze jejich syntézou *de novo* (Hug *et al.*, 1999). Byla však identifikována třída substrátů, které jsou schopné měřit aktivitu kaspáz. Nejdůležitějším a nejpoužívanějším ze substrátů je Rhodamin 110. Aminokupiny Rhodaminu 110 jsou navázány na aminokyseliny nebo peptidy. Princip stanovení spočívá v tom, že se nefluorescenční bis-substituované peptidové deriváty štěpí na zelený fluorescenční monosubstituovaný Rhodamin 110 a na volný Rhodamin 110 (Rothe *et al.*, 1992). Fluorescence Rhodaminu 110 je měřena po excitaci světlem laserového paprsku při vlnové délce 488 nm. Jelikož jsou tyto substráty pro buňky volně dostupné, je nutné měřit aktivitu kaspáz pouze u neporušených buněk. Detekce je prováděna pomocí průtokového cytometru (Hug *et al.*, 1999).

Mezi jiné fluorescenční substráty patří sekvence čtyř aminokyselin, kyselina asparagová-kyselina glutamová-valin-kyselina asparagová (DEVD). Tato sekvence je specificky štěpena kaspázou-3. Kaspázou-1 je štěpena sekvence tyrosin-valin-alanin-kyselina asparagová (YVAD). DEVD a YVAD byly zavedeny mezi modrý a zelený fluorescenční protein. Tyto purifikované substráty jsou štěpeny okamžitě po vystavení purifikovaným kaspázám. V určitých buněčných liniích byly tyto substráty štěpeny kaspázami vlivem inhibitoru proteinkinázy. Tyto substráty umožňují určit aktivaci kaspázy-1 a kaspázy-3 během apoptózy a umožňují jejich aktivaci při detekci *in vitro* (Mahajan *et al.*, 1999).

Při detekci buněk, které podstoupily apoptózu může být použita metoda pomocí fluorescenčně značených inhibitorů kaspáz (FLICA) které mohou být značeny sulforhodaminem pro aplikaci na živé buňky *in vitro*. Stanovení může být kombinováno i s jinými metodami např. s vitálním barvením pomocí PI. Metoda FLICA je velmi jednoduchá, rychlá a je použitelná jak pro fluorescenční mikroskopii, tak i pro průtokovou cytometrii (Darzynkiewicz *et al.*, 2017). Aktivaci kaspáz pomocí fluorescenčních značek můžeme detekovat i na speciálních průtokových cytometrech. Tyto průtokové cytometry jsou vybaveny argonovým laserem. Nebo se může jednat o duální přístroje, které jsou vybaveny červenou diodou nebo helium-neonovým laserem. Jednotlivé fluorochromy jsou vybírány v závislosti na dostupnosti vybraných průtokových cytometrů (Telford *et al.*, 2004).

7. Závěr

Bakalářská práce je literární rešerší, jejímž cílem bylo charakterizovat a klasifikovat kaspázy a shrnout také roli kaspáz v jednotlivých procesech buněčné smrti.

Dosud bylo identifikováno 14 kaspáz, které jsou rozděleny do několika kategorií. První skupina kaspáz se podílí na apoptóze, a dále je klasifikována do podskupin na iniciační a exekutorové. Druhou skupinou jsou kaspázy, které se podílejí na zánětu. Kaspázy lze dělit i dle struktury prodomény na iniciační apoptotické, zánětlivé a efektorové. Nejdůležitější, a také velmi rozmanitá, je role kaspáz v procesu programované buněčné smrti apoptózy. Při absenci některé z kaspáz může docházet např. k tvorbě nádorů nebo k poruchám vývoje sluchových svalů, jejich inhibice může mít však i kladný vliv, může totiž docházet ke zpomalení procesů souvisejících se stárnutím. Kaspázy rovněž dokáží poskytnout ochranu před kyslíkovými radikály a tím i před nekrózou, ale jejich nedostatečná exprese může vést k nekroptóze. Jejich úloha je i v pyroptické buněčné smrti infikovaných makrofágů, inhibici autofagie a možný vliv kaspáz je zkoumán i u onkózy.

Můžou však existovat i buněčné smrti, které nejsou závislé na kaspázách. Unikátní forma této buněčné smrti se nazývá parthanatos, jejíž aktivace je závislá na mitochondriálním AIF, nikoli na kaspázách.

Pochopením, jak jednotlivé kaspázy fungují a jak je lze regulovat, inhibovat nebo naopak aktivovat, by mohlo dojít ke zlepšení léčby spousty onemocnění, jako jsou např. některé neurodegenerativní poruchy, či zánětlivé nebo autoimunitní choroby. Rovněž by také mohlo dojít k zefektivnění léčby některých druhů nádorů.

8. Seznam použité literatury:

- 1) **Adigun, R; Bhimji, SS.** Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous). *StatPearls Publishing*, Treasure Island, FL, USA, 2017.
- 2) **Anding, Al; Baehrecke, EH.** Autophagy in cell life and cell death. *Curr Top Dev Biol*, 2015, 114, 67-91.
- 3) **Arnoult, D; Gaume, B; Karbowski, M; Sharpe, JC; et al.** Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*, 2003, 22, 4385-4399.
- 4) **Balvan, J; Krizova, A; Gumulec, J; Roudenska, M; et al.** Multimodal holographic Microscopy: Distincion between apoptosis and oncosis. *PloS ONE*, 2015, 10, 2.
- 5) **Brough, D; Rothwell, RJ.** Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci*, 2007, 120, 772-781.
- 6) **Constantinou, C; Papas, KA; Constantinou, AL.** Caspase-independent pathways of prograded cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy? *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9, 717-728.
- 7) **Cowling, V; Downward, J.** Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Difer*, 2002, 9, 1046-1056.
- 8) **Darzynkiewicz, Z; Zhao, H; Halicka, HD; Pozarowski, P; et al.** Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases: expedient *in vitro* and *in vivo* markers of apoptotic cells for rapid cytometric analysis. *Methods Mol Biol*, 2017, 61-73.
- 9) **Dekterev, A; Hitomi, J; Gernscheid, M; Ch'en, IL; et al.** Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*, 2008, 4, 313-321.
- 10) **Denault, JB; Békes, M; Scott, FL; Sexton, KM; et al.** Engineered hybrid dimers: tracking the activation patheay of caspase-7. *Mol Cell*, 2006, 23, 523-533.

- 11) **Dvorak, HF.** Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3, 1-11.
- 12) **Ekert, PG; Read, SH; Silke, J; Marsde, VS; et al.** Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol*, 2004, 165, 835-842.
- 13) **Elmore, S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35, 495-516.
- 14) **Fan, TJ; Han, LH; Cong, RS; Lianh, J.** Caspase family protease and apoptosis. *Acta Biochim Biphys Sin*, 2005, 37, 719-727.
- 15) **Fatokun, AA; Dawson, VL; Dawson, TM.** Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 2014, 171, 2000-2016.
- 16) **Fesik, SW.** Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, 2000, 103, 273-282.
- 17) **Ficková, M; Nagy, N.** Apoptoza- programovaná bunková smrť a rastlinné metabolismy. *Chem Listy*, 2007, 131-137, 1213-7103.
- 18) **Fink, SL; Cookson, BT.** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of death and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 2005, 73, 1907-1916.
- 19) **Fink, SL; Cookson, BT.** Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell mikrobiol*, 2006, 8, 1812-1825.
- 20) **Fitzwalter, BE; Thorburn, A.** Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS Journal*, 2015, 282, 4279-4288.
- 21) **Ford, CA; Petrova, S; Pound, JD; Voss, JJLP; et al.** Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma. *Curr Biol*, 2015, 25, 577-588.
- 22) **Franchi, L; Muñoz-Planillo, R; Núñez, G.** Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat imunol*, 2012, 13, 325.

- 23) **Frantz, S; Ducharme, A; Sawyer, D; Rohde, LE; et al.** Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35, 685-694.
- 24) **Fulle, S; Sancilio, S; Mancinelli, R; Gatta, V; et al.** Dual role of the caspase enzymes in satellite cells from aged and young subjects. *Cell Death Dis*, 2013, 4, e955.
- 25) **Galluzzi, L; Kroemer, G.** Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 2008, 135, 1161-1163.
- 26) **Gemma, C; Fister, M; Hudson, C; Bickford, PC.** Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *Eur J Neurosci*, 2005, 22, 1751-1756.
- 27) **Gero, D; Szabo, C.** Poly(ADP-ribose) polymerase: a new therapeutic target? *Curr Opin Anaesthesiol*, 2008, 21, 11-121.
- 28) **Golstein, P; Kroemer, G.** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32, 37-43.
- 29) **Gozuacik, D; Kimchi, A.** Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 78, 217-245.
- 30) **Günther, C; Martini, E; Wittkopf, N; Aman, K; et al.** Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 2011, 477, 335.
- 31) **Han, J; Zhong, ChQ; Zhang, DW.** Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat immunol*, 2011, 12, 1143.
- 32) **Hu, B; Elinav, E; Huber, S; Booth, CJ; et al.** Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2010, 107, 21635-21640.
- 33) **Hug, H; Los, M; Hirt, W; Debatin, KM.** Rhodamine 110-linked amino acid and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells. *Biochemistry*, 1999, 38, 13906-13911.
- 34) **Jäger, R; Zwacka, RM.** The enigmatic roles of caspases in tumor development. *Cancers*, 2010, 2, 1952-1979.

- 35) **Julien, O; Wells, JA.** Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 2017, 24, 1380.
- 36) **Kaiser, WJ; Upton, JW; Long, AB; Livingston-Rosanoff, D; et al.** RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 2011, 471, 368-372.
- 37) **Kayagaki, T; Warming, S; Lamkanfi, M; Vande Walle, L; et al.** Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 2011, 479, 117-121.
- 38) **Kovalenko, A; Kim, JC; Kang, TB; Rajput, A; et al.** Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *J Exp Med*, 2009, 206, 2161-2177.
- 39) **Kroemer, G; Galluzzi, L; Brenner, C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007, 87, 99-163.
- 40) **Kroemer, G; Galluzzi, L; Vandenabeele, P; Abrams, J; et al.** Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell death 2009. *Cell Death Differ*, 2009, 16, 3-11.
- 41) **Lee, HJ; Pyo, JO; Oh, Y; Kim HJ; et al.** AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat Cell Biol*, 2007, 9, 1303-1310.
- 42) **Lee, ChY; Clough, EA; Yellon, P; Teslovich, TM; et al.** Genome-wide analyses of steroid-and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2003, 13, 350-357.
- 43) **Lee, P; Lee, DJ; Chan, C; Chen SW; et al.** Dynamic expression of epidermal caspase 8 simulates a wound healing response. *Nature*, 2009, 458, 519-523.
- 44) **Lemaire, Ch; Andréau, K; Souvannavong, V; Adam, A.** Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS letters*, 1998, 425, 266-270.
- 45) **Li, C; Lasse, S; Nakasaki, M; Chen, SW; et al.** Development of atopic dermatitis-like skin disease from the chronic loss of epidermal caspase-8. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2010, 107, 22249-22254.

- 46) **Liu, X; Vleet, TV; Schnellmann, RG.** The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44, 349-370.
- 47) **Mahajan, NP; Harrison-Shostak, DC; Michux, J; Herman, B.** Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. *Chem Biol*, 1999, 6, 401-409.
- 48) **Mao, P; Smith, L; Xie, W; Wang, M.** Dying endothelial cells stimulate proliferation of malignant glioma cells via a caspase 3-mediated pathway. *Oncol Lett*, 2013, 5, 1615-1620.
- 49) **Martinon, F; Hofmann, K; Tschopp, J.** The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol*, 2001, 11, 118-120.
- 50) **McIlwain, DR; Berger, T; Mak, TW.** Caspase function in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5, 1-28.
- 51) **Menéndez, J; Pérez-Garijo, A; Calleja, M; Morata, G.** A tumor-suppressing mechanism in Drosophila involving cell competition and the Hippo pathway. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2010, 107, 14651-14656.
- 52) **Miao, EA; Rajan, JV; Aderem, A.** Caspase-1 induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*, 2011, 243, 206-214.
- 53) **Mizushima, N; Levine, B; Cuervo, AM; Klionsky DJ.** Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451, 1069.
- 54) **Morishima, N; Nakanishi, K; Takenouchi, H; Shibata, T; et al.** An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis: cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*, 2002, 277, 34287-34294.
- 55) **Oberst, A; Green, DR.** It cuts both ways: Reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12, 757-763.
- 56) **Pasparakis, M; Vandenabeele, P.** Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 2015, 517, 311-320.

- 57) **Patel, PH; Dutta, D; Edgar, BA.** Niche appropriation by *Drosophila* intestinal stem cell tumours. *Nat. Cell Biol*, 2015, 17, 1182.
- 58) **Pop, C; Salvesen, GS.** Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, 2009, 248, 21777-21781.
- 59) **Rao, RV; Hermel, E; Castro-Obregon, S; del Rio, G; et al.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *J Biol Chem*, 2001, 275, 33869-33874.
- 60) **Ravikum, B; Sarkar, S; Davies, JE; Futter, M; et al.** Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2010, 90, 1383-1435.
- 61) **Rothe, G; Klingel, S; Assfalg-Machleidt, I; Machleidt, W; et al.** Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1992, 373, 547-545.
- 62) **Salmena, L; Lemmers, B; Hakem, A; Matsiyak-Zablocki, E; et al.** Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*, 2003, 17, 833-895.
- 63) **Salminen, A; Kaarniranta, K; Kauppinen, A.** Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)*, 2012, 4, 166-175.
- 64) **Shaliny, S; Dorstyn, L; Dawar, S; Kumar, S.** Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death Differ*, 2015, 22, 526-539.
- 65) **Schaeffer, EL; da Silva, ER; de A. Novaes, B; Skaf, HD; et al.** Differential roles of phospholipases A₂ in neuronal death and neurogenesis: Implications for Alzheimer disease. *Prog Neuro-Psychopharmacil Biol Psychiatry*, 2010, 34, 1381-1389.
- 66) **Tait SWG; Green DR.** Caspase independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*, 2008, 27, 6452-6461.
- 67) **Tait, SWG; Ichim, G; Green, DR.** Die another way-non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*, 2014, 127, 2135-2144.

- 68) **Takeuchi, O; Akira, S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, 140, 805-820.
- 69) **Telford, WG; Komoriya, A; Packard, BZ.** Multiparametric analysis of apoptosis by flow and image cytometry. *Methods Mol Biol*, 2004, 263, 141-159.
- 70) **Thornberry, NA; Lazebnik, Y.** Caspases: Enemies within. *Science*, 1998, 281, 1312-1316.
- 71) **Tiwari, M; Sharma, LK; Vanegas, D; Callaway, DA; et al.** A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2. *Autophagy*, 2014, 10, 1054-1070.
- 72) **Valfolomeev, EE; Schuchmann, M; Luria, V; Chiannikulchai, N; et al.** Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 1998, 9, 267-276.
- 73) **Vande Walle, V; Lamkanfi, M.** Pyroptosis. *Curr Biol*, 2016, 26, R568-R572.
- 74) **Vercammen, D; Beyaert, R; Denecker, G; Van Loo, G; et al.** Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 1998, 187, 1477-1485.
- 75) **Weber, CH; Vincenz, C.** The death domain superfamily: a tale of two interfaces?. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26, 475-481.
- 76) **Weerasinghe, P; Buja, LM.** Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93, 302-308.
- 77) **Weerasinghe, P; Hallock, S; Brown, R; Buja, LM.** Apoptosis and Beyond: The many ways cells die. *Wiley*, 2018, 567-582.
- 78) **Wilson, NS; Dixit, V; Ashkenazi, A.** Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunol*, 2009, 10, 348-355.
- 79) **Yeh, WC; Itie, A; Elia, AJ; Ng, M; et al.** Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, 2000, 12, 633- 642.

- 80) **Yu, L; Alva, A; Su, H; Dutt, P; et al.** Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 2004, 304, 1500-1502.
- 81) **Yu, L; Strandberg, L; Lenardo, MJ.** The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy*, 2008, 4, 567-573.
- 82) **Zhang, H; Zhou, X; McQuade, T; Li, J; et al.** Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nature*, 2011, 471, 373-376.
- 83) **Zhang, L; Wang, H; Ding, K; Xu, J.** FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett*, 2015, 236, 43-59.