

Jože Pižem<sup>1</sup>, Andrej Cör<sup>2</sup>

# Kaspaze

## *Caspases*

---

### IZVLEČEK

---

**KLJUČNE BESEDE:** kaspaze, apoptoza

Kaspaze so cisteinske proteaze, ki cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartatom. V celicah so prisotne v neaktivni obliki (prokaspaze). Sodelujejo pri procesiranju citokinov in igrajo osrednjo vlogo pri uravnavanju apoptoze (programirane celične smrti). Kaspaze, ki sodelujejo pri apoptozi, delimo v aktivatorske (kaspazi 8 in 9) in efektorske (kaspazi 3 in 7). Apoptozo lahko sprožijo različni zunajcelični ali znotrajcelični signali. Zunajcelični signali delujejo preko receptorjev smrti in aktivirajo kaspazo 8, znotrajcelični (poškodba celice) pa povzročijo sproščanje citokroma C iz mitohondrijev, kar vodi v aktivacijo kaspaze 9. Aktivirani kaspazi 8 in/ali 9 sprožita kaskadno aktivacijo efektorskih kaspaz, te pa cepijo različne celične beljakovine – kaspazne substrate. Razgradnja celičnih beljakovin je odgovorna za značilne morfološke spremembe apoptotskih celic.

---

### ABSTRACT

---

**KEY WORDS:** caspases, apoptosis

Caspases are cysteine proteases, which cleave their substrates following an aspartate residue. They are present as inactive precursors (pro-caspases) in cells. Caspases are involved in cytokine processing and apoptosis (programmed cell death) regulation. Apoptotic caspases are activator caspases (caspases 8 and 9) or effector caspases (caspases 3 and 7). Apoptosis can be initiated by either extracellular or intracellular pathways. Extracellular signals mediate apoptosis by death receptors, which activate caspase 8. Intracellular signals provoke changes in the permeability of the outer mitochondrial membrane which permits cytochrome C release from mitochondria. In the cytosol, cytochrome C allows activation of caspase 9. Activated caspases 8 and/or 9 induce cascade activation of effector caspases which cleave different target proteins. Demolition of target proteins plays an important role in morphological changes of apoptotic cells.

---

<sup>1</sup> Jože Pižem, dr. med., Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1105 Ljubljana.

<sup>2</sup> Doc. dr. Andrej Cör, dr. med., Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1105 Ljubljana.

## UVOD

Število celic v tkivu uravnava dva osnovna biološka procesa – celična delitev in celična smrt. Poznani sta dve obliki celične smrti – nekroza in apoptoza. Apoptozo kot obliko celične smrti je – glede na značilne spremembe celic – prvič opisal John Kerr (1). Apoptoza je zapleteno uravnavan biološki proces (2–4). Motnje v uravnavanju apoptoze lahko vodijo v presežek celic (tumorji) ali v prekomerno izgubo celic (nevrodegenerativne bolezni, ishemične poškodbe tkiv).

Apoptoza je v bistvu morfološki fenomen, saj apoptotske celice prepoznamo po značilnih morfoloških spremembah – po kondenzaciji jedrnega kromatina in spremembi oblike celice (5). Danes je znano, da so za te spremembe odgovorne cisteinske proteaze, ki cepijo peptidno verigo za aminokislino asparatom. Imenujemo jih kaspaze (angl. *caspase* – *cysteine aspartyl-specific protease*).

Poznani sta dve skupini kaspaz – prva igra osrednjo vlogo v procesu apoptoze (apoptotske kaspaze), druga pa sodeluje pri vnetnem odgovoru organizma (vnetne kaspaze).

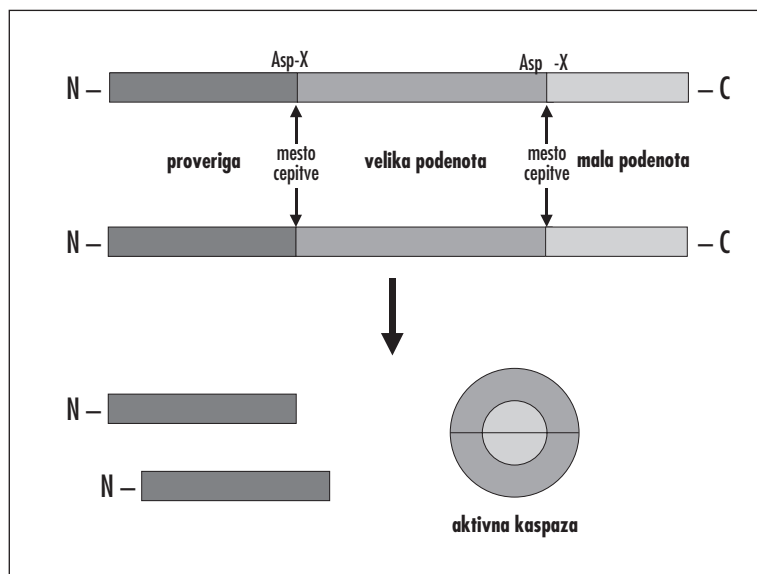
Namen prispevka je predstaviti osnovne biološke značilnosti kaspaz in predvsem njihovo vlogo v procesu apoptoze.

## Značilnosti kaspaz

Kaspaze so prisotne v neaktivni obliki (prokaspaze) v praktično vseh živalskih celicah. Za njihovo aktivacijo je potrebna proteolitična cepitev na dveh mestih. Tako se od prokaspaze odcepi proveriga, iz preostalega dela pa nastaneta dve podenoti – velika in mala. Aktivna kaspaza je sestavljena iz dveh heterodimerov – dveh velikih in dveh malih podenot (slika 1) (6, 7).

Pri sesalcih je poznanih 14 različnih kaspaz. Glede na podobnosti v zgradbi jih delimo v dve veliki skupini – skupino ICE in skupino CED 3 (8). Prva je poimenovana po kaspazi 1, ki je bila prva izolirana kaspaza, in je interlevkin konvertirajoči encim (angl. *interleukin-1 $\beta$  converting enzyme*, ICE). V to skupino sodijo poleg kaspaze 1 še kaspaze 4, 5, 11 in 13. Sodelujejo pri procesiranju citokinov in jih zato imenujemo tudi vnetne kaspaze. Zdi se, da pri apoptozi ne igrajo pomembnejše vloge. V skupino CED 3 sodijo kaspaze, ki sodelujejo pri apoptozi. To so kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, 9 in 10. Za kaspazi 12 in 14 je še premalo podatkov, ki bi omogočili uvrstitev v eno od skupin (9).

CED 3 je protein, ki je pri *Caenorhabditis elegans* udeležen v uravnavanju celične smrti in je funkcionalno kaspaza. *C. elegans*



Slika 1. Zgradba prokaspaz in njihova aktivacija.

je majhen črv, pri katerem se med somatskim razvojem tvori natanko 1090 celic, od tega jih gre 131 v apoptozo. Ključna spoznanja o molekularnih mehanizmih celične smrti izhajajo prav iz genetskih raziskav na *C. elegans*. V primeru mutacije gena *ced 3* se apoptoza ne pojavi in vseh 1090 celic preživi.

Kaspaze sodijo med zelo selektivne proteaze. Prepoznajo relativno kratko zaporedje štirih aminokislin, ki jih označujemo s  $P_1, P_2, P_3$  in  $P_4$  ( $P$  – za angl. *position*), pri čemer je  $P_4$  na N-koncu,  $P_1$  pa na C-koncu peptidne verige. Na  $P_1$  je vedno aspartat, na  $P_2$  različne aminokislino, na  $P_3$  najpogosteje glutamat, aminokislina na mestu  $P_4$  pa določa substratno specifičnost različnih kaspaz (8). Glede na aminokislino na položaju  $P_4$  delimo kaspaze v tri skupine. V skupino I, ki ustreza skupini ICE, sodijo kaspaze z afiniteto do hidrofobnih aminokislin na  $P_4$ . Kaspaze v skupini II imajo afiniteto do aspartata na  $P_4$ , v skupini III pa do razvejanih aminokislin. Kaspaze skupine II in III sodelujejo pri apoptozi in skupaj tvorijo skupino CED 3. Delitev kaspaz glede na zgradbo, substratno specifičnost in funkcijo je povzeta v tabeli 1.

## AKTIVACIJA KASPAZ MED APOPTOZO

Pri proteolitični aktivaciji prokaspaz pride do cepitve za aspartatom v tetrapeptidnem zaporedju, ki je značilno za substrate kaspaz (glej zgoraj). To pomeni, da 1. prokaspazo lahko aktivira le kaspaza in 2. gre pri aktivaciji kaspaz za proteolitično kaskado (10). Iz tega sledi, da morajo vsaj nekatere kaspaze (prokaspaze) aktivirati same sebe. Kaspaze iz skupine III (kaspaze 6, 8, 9, 10) imajo afiniteto do tetrapeptidnega zaporedja, ki se nahaja na cepitvenih mestih prokaspaz iz sku-

pine II in III. Poleg tega je značilno, da imajo kaspaze iz skupine III tudi v neaktivni obliki (prokaspaze) relativno veliko proteolitično aktivnost. To opredeljuje pojem cimogenost, ki je razmerje med aktivnostjo aktivirane (kaspaze) in neaktivirane proteaze (prokaspaze). Cimogenost kaspaze 9 je 10, kaspaze 8 pa 100. Cimogenost kaspaz iz skupine II je nekaj 10-krat višja (11). Značilnost kaspaz iz skupine III je tudi dolga proveraiga, ki sodeluje pri vezavi prokaspaze na druge proteine, ki delujejo kot alosterični modulatorji in povečajo proteolitično aktivnost prokaspaze. Nizka cimogenost, dolga proveraiga in afiniteta do lastnega tetrapeptidnega zaporedja daje kaspazam iz skupine III sposobnost samoaktivacije. V nasprotju s kaspazami iz skupine III imajo kaspaze iz skupine II visoko cimogenost ter kratko proveraigo in niso sposobne samoaktivacije, lahko pa jih aktivirajo kaspaze iz skupine III. Tako imenujemo kaspaze iz skupine III aktivatorske (iniciratorske) kaspaze – saj so sposobne samoaktivacije in aktivacije drugih kaspaz, kaspaze iz skupine II pa efektorske (12).

## POTEK APOPTOZE

Potek apoptoze lahko delimo v štiri faze (9):

- začetek: na celico vplivajo različni znotraj- in zunajcelični signali, ki lahko sprožijo apoptozo;
- sproženje: v tej fazi postane proces apoptoze nepovraten;
- pospešitev: pride do kaskadne aktivacije kaspaz;
- razgradnja: efektorske kaspaze cepijo številne celične beljakovine, kar povzroči značilne morfološke spremembe celice.

Tabela 1. Delitev kaspaz glede na zgradbo, substratno specifičnost in funkcijo.

podobnost v zgradbi	substratna specifičnost	Kaspaze	
		kaspaza	funkcija
ICE	I	1, 4, 5, 11, 13	procesiranje citokinov
CED 3	II	2*, 3, 7	efektorske kaspaze
	III	6**, 8, 9, 10	aktivatorske kaspaze

\* Kaspaza 2 je sposobna samoaktivacije.

\*\* Kaspaza 6 ima lahko tudi funkcijo efektorske kaspaze.

Poznane so tri signalne poti, ki lahko sprožijo apoptozo: 1. ekstrinzična pot preko t. i. receptorjev smrti, 2. intrinzična pot in 3. sproščanje vsebine zrnca iz citotoksičnih limfocitov T in naravnih celic ubijalk (9, 13).

### Ekstrinzična pot

Apoptozo lahko sproži vezava ligandov na receptorje smrti (angl. *death receptors*). To je skupina receptorjev znotraj družine receptorjev TNF (faktor tumorske nekroze, angl. *tumour necrosis factor*). Najbolj sta raziskana dva receptorja smrti – CD95/Fas/APO-1 in TNF-R1. Za receptorje smrti je značilno t. i. področje DD (angl. *death domain*) na citoplazmatskem delu receptorja. Po vezavi liganda na receptor se na področje DD veže adaptersko beljakovino. Na Fas in TNFR1 se lahko vežeta adapterski beljakovini FADD/MORT1 (angl. *Fas-associated protein with death domain*) ali TRADD (angl. *TNF receptor associated protein with death domain*). Adapterske beljakovine imajo dve vezavni mesti, s področjem DD se vežejo na DD receptorja, s področjem DED (angl. *death effector domain*) pa na istoimensko področje kaspaze 8, ki se nahaja na njeni proverigi (9). Način aktivacije prokaspaze 8 poskuša razložiti t. i. »model približanja« (angl. *induced proximity model*) – povezava med adapterskimi beljakovinami in prokaspazo 8 omogoči, da se posamezne prokaspaze 8 približajo druga drugi, kar omogoči njihovo transaktivacijo (10).

Kaspaza 8 je torej ključna aktivatorska kaspaza, ki se aktivira po ekstrinzični poti. Na podoben način pride verjetno do aktivacije kaspaze 2, vendar pa je njena dejanska vloga nejasna, saj pri kaspaza 2<sup>-/-</sup> miših, potek apoptoze, sprožen s TNF  $\alpha$  (faktor tumorske nekroze  $\alpha$ , angl. *tumour necrosis factor  $\alpha$* ), poteka normalno (14).

Z delovanjem na ekstrinzično pot pospešujejo apoptozo tudi nekateri kemoterapevtiki in citotoksični limfociti T. Slednji imajo na svoji površini ligand, ki se veže na receptor CD95 (15).

### Intrinzična pot

Poškodba celice zaradi sevanja, delovanja citotoksičnih snovi, odsotnosti dejavnikov preživetja in drugih škodljivih vplivov lahko sproži apoptozo. Čeprav so natančni meha-

nizmi, kako številni škodljivi vplivi sprožijo apoptozo, nepoznani, se zdi, da večina signalnih poti poteka preko mitohondrijev (9).

### Citotoksični limfociti T in naravne celice ubijalke

Poleg že omenjene sposobnosti vezave na receptor CD95 in s tem aktivacije kaspaze 8 lahko citotoksični limfociti T in naravne celice ubijalke sprožijo apoptozo tako, da sprostijo vsebino svojih zrnca na površino celice (angl. »the kiss of death«). V zrncah se nahajata perforin in grancim B (serinska proteaza). Perforin naredi pore v celični membrani, te pa omogočijo vstop grancima B v celico. Grancim B cepi prokaspaze in jih s tem neposredno aktivira. *In vitro* lahko aktivira večino kaspaz, *in vivo* pa se zdi, da aktivira predvsem kaspazo 3 (9).

### Sproženje apoptoze

V fazi sproženja apoptoze pride do ključnih biokemičnih sprememb v mitohondrijih, glavna značilnost pa je povečanje prepustnosti zunanje mitohondrijske membrane in sproščanje citokroma C ter drugih proteinov, ki se normalno nahajajo v medmembranskem prostoru, iz mitohondrija (9). Te spremembe lahko sprožijo 1. signali, ki izvirajo iz celice in so neodvisni od kaspaz (intrinzična pot), ali 2. signali preko receptorjev smrti ali grancima B, ki so odvisni od kaspaz. Spremembe v mitohondrijih so verjetno ključne za celično smrt in niso le njen naključni spremljevalec (16).

Mehanizem sproščanja citokroma C iz mitohondrija je kompleksen in še ni v celoti poznan. Med apoptozo mitohondriji nabreknejo in kontinuiteta zunanje mitohondrijske membrane se prekine, vendar se to pojavi pozno v procesu apoptoze. Do sproščanja citokroma C pride pred nabrekanjem, kar kaže na to, da je v ozadju zapletenejši mehanizem. Verjetno se citokrom C sprošča skozi pore v zunanji mitohondrijski membrani, ki jih tvorita proteina Bak in Bax iz družine Bcl-2. Za tvorbo por je potrebna oligomerizacija teh dveh beljakovin. Le-to pospešuje beljakovina cBid. Beljakovina cBid je C-terminalni del beljakovine Bid, ki se nahaja prosto v citosolu in prav tako kot Bak in Bax pripada družini Bcl-2. Beljakovina cBid se sprosti po delovanju aktivirane kaspaze 8.

Na ta način je ekstrinzična pot aktivacije apoptoze povezana z intrinzično (9, 16) (slika 2).

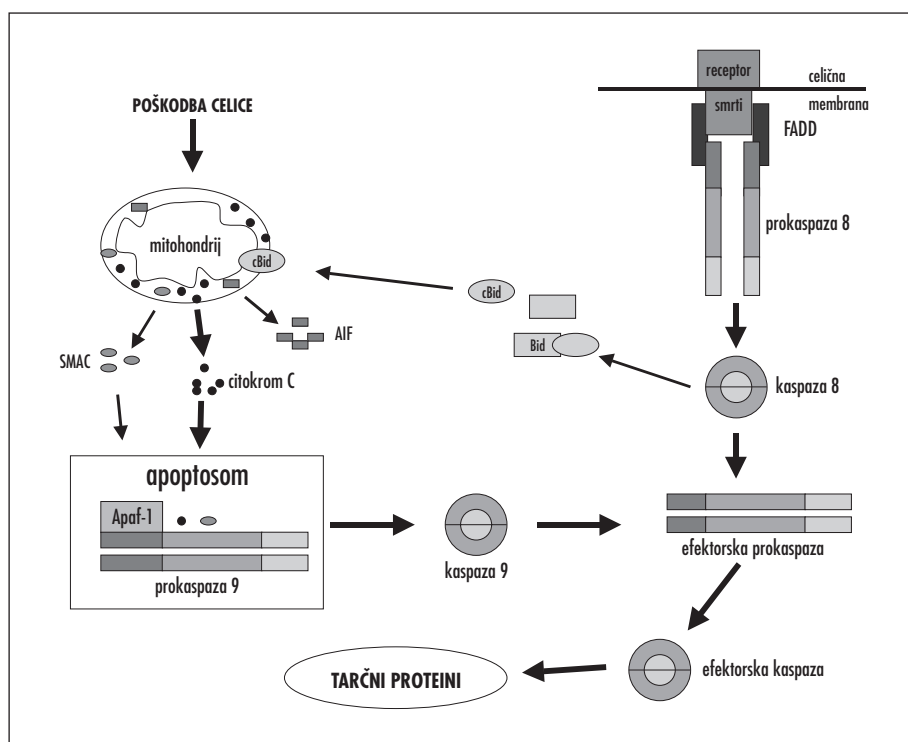
Citokrom C se v citosolu veže na beljakovino Apaf-1 (angl. *apoptosis-activating factor 1*) in ga s tem aktivira. Aktivirane beljakovine Apaf-1 se povežejo s prokaspazo 9 v kompleks, ki ga imenujemo apoptosom. V apoptosomu pride do transaktivacije prokaspaze 9. Mehanizem je podoben kot pri transaktivaciji kaspaze 8. Aktivirana kaspaza 9 ostane v apoptosomu, saj je tako njena proteolitična aktivnost večja. Za aktivacijo kaspaze 9 je potrebna energija v obliki ATP/dATP (10, 16, 17).

Apoptosom torej sestavljajo citokrom C, Apaf-1 in kaspaza 9. Poleg teh beljakovin pa so lahko prisotne še pomožne beljakovine. Ena takih je beljakovina SMAC (angl. *second mitochondrial activator of caspases*), ki se prav tako kot citokrom C sprosti iz mitohondrija, v apoptosomu pa zmanjša potrebo po ATP (16).

Na ravni mitohondrija in tvorbe apoptosoma uravnava apoptozo beljakovine iz družine Bcl-2. Danes je poznanih okrog 20 beljakovin iz te družine. Nekatere apoptozo pospešujejo

(Bak, Bax Bid), druge pa jo zavirajo (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>). Natančni mehanizmi njihovega delovanja niso poznani, možni mehanizmi pa so: 1. tvorba por v zunanji mitohondrijski membrani, 2. vezava na beljakovine, ki uravnava homeostazo v mitohondrijih, 3. vezava na adapterske beljakovine in s tem uravnavanje aktivacije kaspaz in 4. vezava na druge beljakovine iz družine Bcl-2 (tvorba heterodimerov) in s tem uravnavanje njihove pro- ali antiapoptotične aktivnosti (13). Pri *C. elegans* se analog beljakovine Bcl-2 (CED 9) veže na analog beljakovine Apaf-1 (CED 4) in s tem prepreči aktivacijo kaspaze (CED 3). Vendar se pri sesalcih Bcl-2 verjetno ne veže na Apaf-1, tako da njen natančen mehanizem zaviranja apoptoze ni poznan. Pri sesalcih se na Apaf-1 verjetno veže Bcl-X<sub>L</sub> in s tem prepreči tvorbo apoptosoma (10, 12, 16).

Iz mitohondrija se v citoplazmo sprošča tudi beljakovina AIF (angl. *apoptosis-inducing factor*). Potuje v jedro in neodvisno od kaspaz lahko cepi DNA na dolge fragmente in povzroči kondenzacijo kromatina, vendar njen dejanski pomen ni poznan (9, 18).



Slika 2. Intrinzična in ekstrinzična aktivacija kaspaz.

## Pospešitev apoptoze

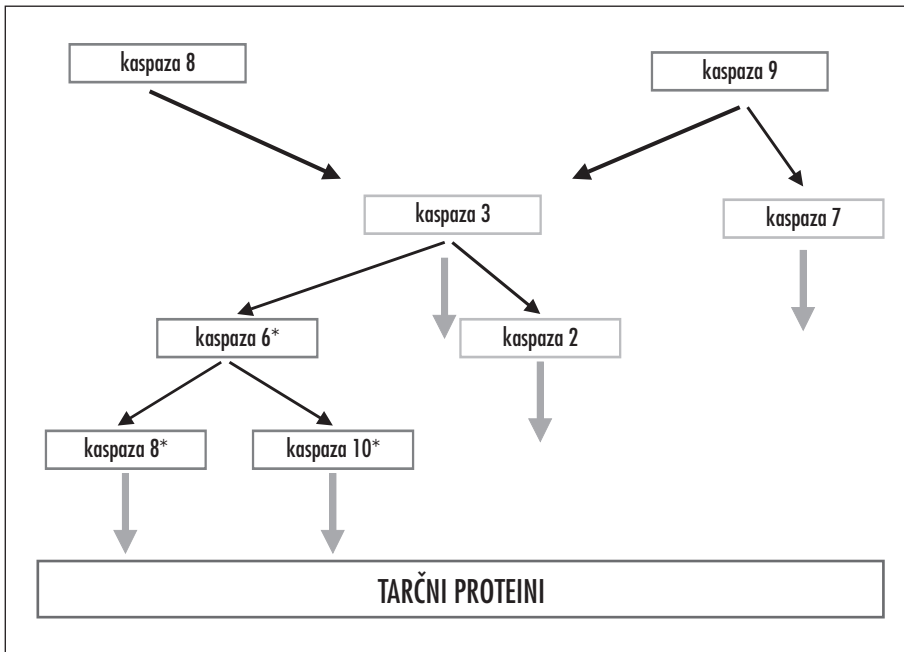
Potem ko je prišlo po ekstrinzični poti do aktivacije kaspaze 8 ali po intrinzični do aktivacije kaspaze 9 (aktivatorskih kaspaz), so ustvarjeni pogoji za hitro kaskadno aktivacijo preostalih (efektorskih) kaspaz. Kaspazna kaskada je prikazana na sliki 3 (9). Čeprav lahko pride do aktivacije številnih kaspaz, igra osrednjo vlogo kaspaza 3. Ta lahko aktivira druge kaspaze, hkrati pa je glavna efektorska kaspaza. Kaspaza 7 se po biokemičnih lastnostih ne razlikuje bistveno od kaspaze 3, vendar *in vivo* ne cepi substratov, ki jih cepi *in vitro*. Zdi se, da je to posledica različne razporeditve v celici (dostopnosti substratov) (14).

V fazi kaspazne kaskade je potek celične smrti že nepovraten. Aktivacija efektorskih kaspaz je odgovorna za značilne morfološke spremembe apoptotske celice. Če s kaspaznimi inhibitorji preprečimo delovanje kaspaz in je prišlo do sproženja apoptoze, kaže celica morfološke znake nekroze (nabrekanje celice, razgradnja celičnih organelov, sproščanje znotrajcelične vsebine v izvencelični prostor, pojav vnetne reakcije), ne pa značilnih znakov apoptoze. Zdi se, da aktivacija kaspaz

odloča o tem, ali bo umirajoča celica kazala znake apoptoze ali nekroze (9, 15, 19). V celicah, v katerih ni kaspaze 3 (kaspaza 3<sup>-/-</sup>), lahko različni dražljaji sprožijo apoptozo, vendar pa le-ta poteka z zapoznelimi morfološkimi spremembami ali brez njih (17).

## Razgradnja tarčnih beljakovin in morfološke spremembe apoptotske celice

Aktivirane (efektorske) kaspaze cepijo številne celične beljakovine, kar povzroči spremembe v apoptotski celici: 1. porušenje homeostaze, 2. ustavitev celičnega ciklusa, 3. inaktivacijo zaviralcev apoptoze, 4. strukturne spremembe in 5. označitev apoptotske celice (spremembo antigenov na površini celice). Poznanih je okrog 70 tarčnih beljakovin – kaspaznih substratov (8). Mednje sodijo beljakovine, ki sodelujejo v celičnem signaliziranju, beljakovine citoskeleta in jedrnega matriksa, zaviralci endonukleaz in drugi. Med najbolj poznanimi in – zdi se, najpomembnejšimi tarčnimi beljakovinami – so: ICAD (angl. *inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*), lamini, fodrin  $\alpha$ , gelsolin, aktin in drugi.



Slika 3. Kaspazna kaskada (\* Aktivatorske kaspaze, ki jih lahko v določenih okoliščinah aktivirajo efektorske kaspaze.)

Celično smrt lahko definiramo kot porušenje metabolične koordinacije, ki je preseglo točko povratnosti (angl. *point of no return*). V poteku apoptoze se to zgodi že pred aktivacijo efektorskih kaspaz, v fazi sproženja, ko pride do ključnih biokemičnih sprememb v mitohondrijih, zato pride do večine morfoloških sprememb v celici že po njeni smrti. Njihova glavna vloga je verjetno v učinkovitosti in za tkivo neškodljivem odstranjevanju mrtvih celic (18, 20).

Znano je, da je za mnoge morfološke spremembe med apoptozo odgovorna kaspaza 3, saj v celicah, ki ne izražajo kaspaze 3 (kaspaza 3<sup>-/-</sup>), ne pride do fragmentacije DNA, kondenzacije kromatina in brstenja citoplazme. Postavlja se vprašanje, ali kaspaza 3 neposredno cepi tarčne beljakovine, ki so odgovorne za morfološke spremembe, ali je učinek posreden, preko aktivacije drugih kaspaz. V celicah z odsotnostjo kaspaz 6 in 7 (kaspaza 6<sup>-/-</sup> in 7<sup>-/-</sup>) cepitev ključnih tarčnih beljakovin ni motena, kar pomeni, da kaspaza 3 le-te cepi neposredno (4).

Morfološke spremembe jedra so za apoptozo značilne in izrazite. Pride do kondenzacije jedrnega kromatina, jedro se skrči in končno razpade na fragmente (5, 21). Vendar so za samo apoptozo te spremembe malo pomembne ali nepomembne (18). Spremembe celičnega jedra so posledica delovanja kaspaz na jedrne beljakovine. Do aktivacije kaspaz pride v citosolu, vendar kaspaza 3 po aktivaciji potuje v jedro in zdi se, da igra ključno vlogo pri cepitvi jedrnih beljakovin. Pomembna je cepitev beljakovine ICAD in laminov.

Beljakovina ICAD je zaviralec endonukleaze CAD (angl. *caspase-activated deoxyribonuclease*). Kaspaza 3 cepi ICAD, s tem pa postane CAD aktivna in cepi jedro DNA. V celicah brez CAD (CAD<sup>-/-</sup>) ne pride do fragmentacije jedrne DNA (14).

Lamini so jedrne beljakovine, ki se nahajajo ob jedrni ovojnici. Njihova cepitev je potrebna za skrčenje jedra in njegovo fragmentacijo. V primeru, ko so v jedru prisotne v mutirani necepljivi obliki, ne pride do značilnih morfoloških sprememb jedra ali pa so vsaj močno zapoznele (13, 18).

Sprememba oblike je ena glavnih značilnosti apoptotske celice. Celica se skrči, loči od ostalih celic v tkivu, pojavijo se izbokline cito-

plazme (brstenje). Končno celica razpade na apoptotska telesa (5). Osnova za to so spremembe citoskeleta. Kaspaze cepijo številne beljakovine, ki gradijo citoskelet ali sodelujejo pri njegovi ureditvi (aktin, gelsolin, fodrin in različne kinaze), vendar so natančni mehanizmi, kako cepitev teh beljakovin vpliva na spremembo citoskeleta, še slabo poznani (18).

Značilnost apoptoze je premik fosfatidilserina iz notranje na zunanjo stran plazmaleme (dvosloja). Za to je odgovorna kaspaza 9 ali od nje odvisna kaspaza, vendar ne kaspazi 3 in 6. Tarčne beljakovine niso poznane (14).

## POMEN POSAMEZNIH KASPAZ

Za boljše poznavanje delovanja posameznih kaspaz *in vivo* so številni raziskovalni centri vzgojili miši, ki ne izražajo določene kaspaze. Celice brez obeh alelov za določeno kaspazo (homozigotno deficitentne) označujemo kot kaspaza<sup>-/-</sup> celice.

Kaspaza 1<sup>-/-</sup> miši ne tvorijo zrelega interlevkina-1 $\beta$  in interlevkina-18 in so odporne na septični šok, sprožen z lipopolisaharidom. Pri teh miših ne najdemo pomembnih motenj v (embrionalnem) razvoju in uravnavanju apoptoze. Podoben fenotip imajo kaspaza 11<sup>-/-</sup> miši, pri katerih najdemo tudi moteno aktivacijo kaspaze 1, kar kaže na to, da kaspaza 11 sodeluje v sintezi interlevkinov preko aktivacije kaspaze 1 (17).

Kaspaza 3<sup>-/-</sup> miši umrejo nekaj tednov po rojstvu. Prisotne so motnje v razvoju osrednjega živčevja, ni pa očitnih razvojnih nepravilnosti v drugih tkivih. Apoptoza v zrelih limfocitih B in T poteka nemoteno, to pa ne velja za zrele limfocite T in B. Vse to kaže, da ima kaspaza 3 ključno vlogo pri uravnavanju apoptoze v določenih, ne pa v vseh tkivih. V vseh apoptotskih celicah so odsotne značilne morfološke spremembe, ni pa moten premik fosfatidilserina na zunanjo stran plazmaleme. V kaspaza 3<sup>-/-</sup> celicah torej lahko pride do apoptoze, vendar ta poteka brez značilnih morfoloških sprememb (22).

Kaspaza 9<sup>-/-</sup> miši imajo hujše motnje v razvoju osrednjega živčevja kot kaspaza 3<sup>-/-</sup> miši. To kaže na to, da kaspaza 9 poleg kaspaze 3 aktivira še druge kaspaze. Kaspaza 9<sup>-/-</sup> timociti so odporni na apoptozo, ki jo sproži deksametazon ali sevanje (intrinzična pot),

medtem ko apoptoza, sprožena preko receptorjev smrti, poteka normalno. Po izpostavitvi deksametazonu pride do sproščanja citokroma C iz mitohondrijev, ne pa do aktivacije kaspaz 3 in 7. Njuno aktivacijo pa lahko sprožijo signali preko receptorjev smrti (17).

Kaspaza 8<sup>-/-</sup> miši imajo motnje v razvoju srčne mišice in krvnih celic in se ne rodijo žive. Kaspaza 8<sup>-/-</sup> timociti so odporni na signale preko receptorjev smrti, normalno pa se odzovejo z apoptozo po izpostavitvi deksametazonu ali sevanju (14, 17).

## URAVNAVANJE AKTIVNOSTI KASPAZ

V zrelih tkivih se večina kaspaz izraža konstitutivno z malo ali brez transkripcijskega uravnavanja. Tako je možno le uravnavanje na potranskripcijski ravni. Poznani sta dve skupini kaspaznih zaviralcev: 1. družina beljakovin IAP (angl. *inhibitor of apoptosis protein*) – gre za t.i. lažne substrat (psevdosubstrati), in 2. lažne kaspaze.

Beljakovine IAP se vežejo na aktivirane kaspaze in jih inhibirajo. Med najboljše poznane proteini IAP sta survivin in XIAP.

Survivin se redko izraža v normalnih celicah, prekomerno pa se izraža v velikem številu tumorjev. Izraža se v odvisnosti od celičnega ciklusa; največjo raven doseže v mitozii. Za razliko od ostalih proteinov IAP je značilno, da ga lahko fosforilira kinaza p53<sup>cdc2</sup>. Zamenja-

va treonina, ki je mesto fosforilacije, za alanin zmanjša sposobnost vezave survivina na kaspazo 9 in s tem njegovo antiapoptotično delovanje (10, 16).

XIAP je močan zaviralec kaspaz 3, 7 in 9. Izraža se v številnih celicah, vendar se izražanje za razliko od survivina ne spreminja skozi celični cikel (16).

Lažne kaspaze nastanejo v procesu alternativnega izrezovanja eksonov in so brez dela verige, ki je odgovorna za proteolitično aktivnost, imajo pa normalno proverejo, ki se veže na adapterske beljakovine (Apaf-1, FADD) in jih s tem blokira (9). Poznani sta kratki obliki kaspaz 9 in 2, ki delujeta kot lažni kaspazi in zavirata apoptozo (12, 17).

## ZAKLJUČEK

Kaspaze igrajo osrednjo vlogo pri uravnavanju apoptoze. Odgovorne so za značilne morfološke spremembe apoptotskih celic ter učinkovito in neškodljivo odstranjevanje le-teh.

Poznavanje mehanizmov, ki uravnavajo apoptozo in aktivacijo kaspaz, omogoča razvoj specifičnih zdravil, ki pospešujejo (zdravljenje tumorjev) ali zavirajo apoptozo (preprečevanje nevrodegenerativnih bolezni in ishemičnih okvar različnih organov). Še zlasti veliko obeta ligand TRAIL (angl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), ki z vezavo na receptor smrti sproži apoptozo po ekstrinzični poti. Zdi se, da deluje selektivno na tumorske celice (15, 23).

## LITERATURA

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–57.
2. Jezernik K. Apoptoza. *Med Razgl* 1999; 38: 69–81.
3. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *TIBS* 1999; 24: 47–53.
4. O'Connor L, Huang DCS, O'Reilly LA, Strasser A. Apoptosis and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 257–63.
5. Cör A, Pajer Z. Apoptoza – programirana celična smrt in tumorji. *Zdrav Vestn* 1994; 63: 521–4.
6. Thornberry NA. Caspases: A decade of death research. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1023–6.
7. Kumar S, Colussi PA. Prodomains – adaptors – oligomerisation: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *TIBS* 1999; 24: 1–4.
8. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028–42.
9. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1067–74.
10. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157 (5): 1415–30.
11. Stennicke HR, Salvesen GS. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1054–9.
12. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1060–6.
13. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770–6.



14. Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Flavell RA. Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1043-53.
15. Kolenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, Finke JH. Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis* 2000; 5: 17-20.
16. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2000; 14: 1340-4.
17. Wang J, Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Science* 2000; 113: 753-7.
18. Häcker G. The morphology of the apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 5-17.
19. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; 6: 508-15.
20. Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 1999; 6: 497-507.
21. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 19-31.
22. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99-104.
23. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407: 810-6.

Prispelo 23. 4. 2001.