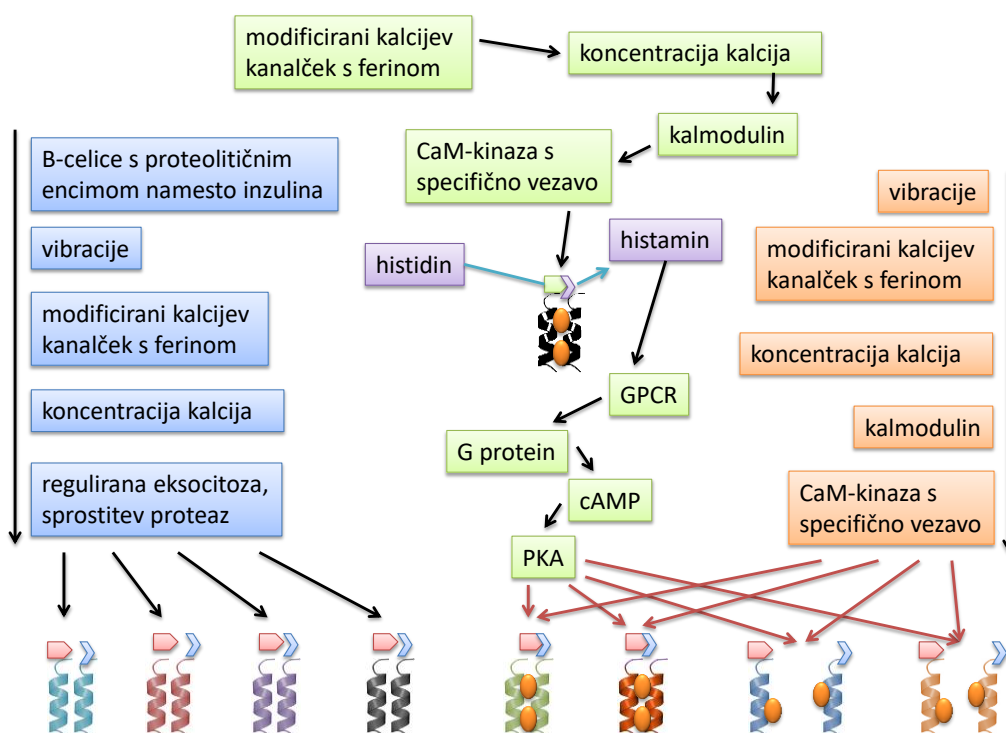


# PREDLOG PROJEKTA

Večina aplikacij v sintezni biologiji je osnovana na ti. počasnem odgovoru celice-transkripcijskih signalizaciji, pri kateri spremembe v okolju spodbudijo sintezo novih proteinov, ki nato opravijo določeno funkcijo. Taka signalizacija zahteva več časa med vhomom in izhodom informacij, saj je med procesiranjem potrebna še transkripcija in translacija. Mnoge aplikacije v sintezni biologiji pa zahtevajo hiter odziv, ki temelji na uporabi proteinov, ki so že v celici in njihovi modifikaciji, ali pa na fosforilaciji. Vhodna informacija pri tem je vezava snovi na receptorsko molekulo ali pa odprtje kanala in posledična sprememba koncentracije snovi v celici in njenega naboja, ki sproži znotrajceličen prenos sporočila. Z razvojem sintezne biologije so se začela pojavljati orodja, kot so optogenetika, sonogenetika in coiled coil (CC) peptidi, ki hitri odziv omogočajo. Predvsem sonogenetika, pri kateri spremembo v okolici in s tem začetek signalne poti začne zvok oz. nihanje snovi, se kaže kot obetavna nova metoda, saj omogoča veliko natančnost z minimalno invazivnostjo. Pri tem pa ima tudi omejitve. Mehanoreceptorji so slabo raziskani v primerjavi z drugimi načini reguliranja odpiranja kanalov, ter pogosto nameščeni na celicah s posebno strukturo (npr. stereocilije v Cortijevem organu) od katere je odvisno delovanje kanalov, zato jih z izjemo nekaterih kanalov (npr. TRPV1, ki se odziva tudi na temperaturo)<sup>1</sup> ne moremo uporabiti v poljubnih celicah, temveč le v specifično diferenciranih. Kanali se tudi ne odzivajo na specifično frekvenco, temveč vse vodijo v enak odziv, ta pa je zelo pogosto povišanje koncentracije kalcijevih ionov. Tako imamo omejeno število možnih inputov. Drugi možni primeri inputa za hitri odziv celice so aktivacija G proteinov po vezavi signalne molekule (večinoma sledi aktivacija kinaz in fosforilacija encimov) ali pa vezava CC peptidov s pomočjo proteaznega encima, majhne molekule in drugih metod. Vezava CC je poseben način regulacije, saj je na vsak monomer ( $\alpha$  heliks) pritrjen del razcepljenega peptida, ki je brez drugega dela neaktiven. Ko poteče dimerizacija CC proteinov, se povežeta tudi pritrjena dela razcepljenih proteinov in združeni protein lahko tako opravlja svojo funkcijo.<sup>2</sup> Toda za vse te metoda je možnost uporabe velika za raziskovalne namene in celične kulture, ne pa za dejanske praktične primere zdravljenja tkiva v telesu. Idealno bi bilo, če bi bilo možno tudi te metode začeti z metodami sonogenetike, tj. ustvarjanje vibracij v specifičnem delu tkiva.

Moj predlog se tako osredotoča na načine, kako bi lahko sprožili potek znotrajcelične signalne poti s pomočjo ultrazvoka (ali drugega načina ustvarjanja vibracij) na čim več načinov in kako bi izkoristili tudi druge znotrajcelične signalne poti, poleg koncentracije kalcija (npr. aktivacija druge vrste kinaz in fosforilacija), za nadzor kar največ kombinacij CC peptidov z razcepljenimi proteini. To omogoča mnogo aplikacij, od zdravljenja bolezni, pri katerih je potrebno popraviti ali spremeniti delovanje večih neodvisnih proteinov do oblikovanja logičnih vrat po Boolovi logiki.



Vhodna informacija ki začne signalizacijo je torej zvočno valovanje. To omogoča prehodnost modificiranega TRPV1 kanala, na katerega je pritrjen nanodelec železovega oksida. Ta se ob valovanju segreje in vrši mehanski pritisk na kanal, zaradi česar se ta odpre, kar močno poveča koncentracijo kalcija v celici. Omeniti je potrebno, da so ionski kanali občutljivi za smer sile, zato je za čim večjo učinkovitost priporočljivo obsevati celice iz več strani, saj se sicer odprejo le tisti kanali, ki so usmerjeni v specifično smer. <sup>1</sup> V prvem primeru signal nato poteče o nemodificirani znotrajcelični signalni poti-zvišana koncentracija kalcija aktivira kalmodulin, ki aktivira CaM-kinaze. Ker želimo, da je fosforilacija specifična, sta tako kinaza kot željeni substrat modificirana tako, da se povežeta med sabo. <sup>3</sup> Substrat je lahko v tem primeru encim, ki ga želimo aktivirati, ali pa CC peptid. Raziskave kažejo, da vezava fosfata na serin prispeva k močnejši povezavi med posameznima heliksoma, vezava na treonin pa k šibkejši povezavi. <sup>4</sup> Teoretično bi lahko vezava večih fosfatnih skupin na specifično oblikovan peptid, na katerega je vezan del razcepljenega proteina, pripeljala do povezave ali prekinitve povezave med vezanima deloma proteina. Pri tem je izjemno pomembno zaporedje aminokislin na heptadah. Na g ali e položaju mora biti arginin, ki se navadno povezuje z glutaminsko kislino, namesto te pa mora biti serin (če želimo, da ob fosforilaciji heliksa povežeta, saj je oblika fosforiliranega serina podobna glutaminski kislini) ali pa treonin (če želimo, da se ob fosforilaciji heliksa razmakneta). Na mestu d mora biti glicin<sup>4</sup> na mestu a pa prav tako majhna, nenabita aminokislina: glicin ali alanin. Na heliks vezan razcepljen protein je lahko tudi kinaza ali fosfataza, ki se z vezavo aktivira, s čimer lahko ustvarimo tudi povratne zanke ali molekule, ki drug drugo vklapljujejo in izklapljujejo stikala.

**Tabela 1: Teoretična zamisel CC peptidov, katerih povezovanje je odvisno od fosforilacije**

	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg
<b>P1</b>	ARRGSAR	ARRGSAR	ARRGSAR	ARRGSAR
<b>P2</b>	ARRGRAS	ARRGRAS	ARRGRAS	ARRGRAS
<b>P3</b>	GRRGSAR	GRRGSAR	GRRGSAR	GRRGSAR
<b>P4</b>	GRRGRAS	GRRGRAS	GRRGRAS	GRRGRAS
<b>P5</b>	ARRGTAR	ARRGEAR	ARRGTAR	ARRGTAR
<b>P6</b>	ARRGRAE	ARRGRAT	ARRGRAT	ARRGRAT
<b>P7</b>	GRRGTAR	GRRGEAR	GRRGTAR	GRRGTAR
<b>P8</b>	GRRGRAE	GRRGRAT	GRRGRAT	GRRGRAT

V drugem primeru fosforilacija poteče s pomočjo proteinske kinaze A (PKA), ki je del signalne poti, ki se začne z vezavo signalne molekule na GPCR receptor, zaradi česar se v celici poveča raven cikličnega AMP, ki aktivira PKA. Signalne molekule, ki sprožijo odgovor, pa je v tkivu težko dozirati, še posebno, če želimo to narediti neinvazivno. V drugem primeru zato signalne molekule (lokalne mediatorje, da dosežejo le bližnje tkivo, npr. GABA ali histamin; celice na katere naj vpliva, morajo tudi imeti primerne receptorje, za histamin npr. H2 receptor <sup>5</sup>) sproščajo celice v bližini, ki pa so dovolj oddaljene od prvega skupka, da nanje lahko fokusiramo drugo signalno valovanje. Spet se odpre TRPV1 kanal, zaradi česar se poveča koncentracija kalcija, aktivira kalmodulin in modificirana CaM-kinaza, ki fosforilira CC peptid, kateri se dimerizira, kar pripelje do aktivacije vezanega proteina. Ta je lahko npr. L-histidinska dekarboksilaza, ki je iz 2 podenot, in katalizira pretvorbo v celici naravno prisotnega histidina v histamin. Ta v bližnjih celicah sproži prej omenjeno signalno pot.

Pri tretjem načinu pa gre za dimerizacijo že narejenih CC peptidov Kemijskega inštituta, na katere je možno vezati dele razcepljenega proteina. <sup>6</sup> Pri teh se lahko sproži dimerizacija preko cepitve specifičnega zaporedja (npr. s pomočjo TEV proteaze; proteaze pa morajo prihajati iz druge vrste, da ne režejo zaporedij, pomembnih za celico) s katerim jih je možno povezati. Proteazo pa je spet težko dozirati v tkivu, razen preko bližnjih celic.  $\beta$ -celice Langerhansovih otočkov sproščajo inzulin s pomočjo nadzorovane sekrecije. Pri tej vrsti eksocitoze se encimi zberejo v veziklih, ki se odcepijo od Golgijevega aparata in se približajo plazmalemi, kjer čakajo na signal. V  $\beta$ -celicah je tak signal dvig koncentracije kalcija, ob katerem se membrana vezikla in plazmalema združita in se produkti izločijo iz celice. Namesto gena za inzulin je možno v celico vstaviti gen za primerno celici tujo proteazo, hkrati pa ponovno uporabiti TRPV1 kanal, s pomočjo katerega lahko sprožimo povišanje koncentracije kalcija v celici, s tem pa sproščanje proteaz. Ponovno je skupek  $\beta$ -celic dovolj odmaknjen od celic, v katerih želimo sprožiti signalno pot, da jih lahko nadziramo z drugim virom valovanja, a dovolj blizu, da se lahko med celicami izmenjujejo snovi. V drugem in

tretjem primeru so lahko celice, ki sproščajo signalne molekule ali proteaze, tudi mikroinkapsulirane in vstavljene na primerno mesto v tkivu.

## MOŽNA APLIKACIJA

Moj predlog se osredotoča predvsem na možnost izkoriščanja večih signalnih poti z enim samim začetnim signalom in preko tega možnost velikih kombinacij odgovorov. Aplikacije teh metod so številčne, saj je možno oblikovanje povratnih zank, logičnih vrat in praktičnih medicinskih aplikacij, pri boleznih, ki zahtevajo delovanje večih proteinov neodvisno. Pomembna pa je tudi za prihodnost sintezne biologije. Do zdaj je veljalo, da sintezna biologija temelji na počasnem odgovoru celice, kar pa je pri zdravljenju bolezni in pri aplikaciji možnosti celic za logične operacije izjemno nepraktično, saj od vhoda informacij do izhoda lahko za obdelavo preteče nekaj ur ali nekaj dni. Po drugi strani pa ta sistem, ki temelji na hitrem odzivu preko spremembe koncentracije snovi v celici, nabitosti celice, fosforilaciji in uporabi že sintetiziranih in v celici prisotnih proteinov in CC pomeni izjemno hitro odzivnost že v nekaj sekundah ali minutah, kar je velik korak v prihodnost. Pozitivna stran predlaganega projekta je tudi, da čeprav vsebuje veliko delov in mnogo možnih poti, ga je možno izpeljati v 5 mesecih, če se testira in predstavi le del sistema (npr, delovanje le enega CC namesto vseh parov) kot dokaz principa. Podrobnejša testiranja za morebitno objavo pa se lahko opravijo v mesecih po samem tekmovanju.

## ENOSTAVNA TEORETIČNA APLIKACIJA

Aplikacije so številčne, vendar pa je ena izmed enostavnih možnosti z dimerizacijo biološko zdravilo za malarijo in raka. Za zdravljenje malarije se trenutno v več kot 90% primerov uporablja antimalarik artemisinin, vendar pa se je začela širiti odpornost plazmodijev (povzročiteljev bolezni). Ta je bila zaenkrat opažena v 5 državah: Kambodži, Laosu, Mjanmaru (Burmi), Tajski in Vietnamu. Te države lahko s svoje geografske postavitve potencialno razširijo odpornost še v Indijo in Afriko. Če se bo odpornost razširila v Afriko, lahko pričakujemo katastrofalne posledice. Ena izmed študij je predvidela vzpon smrtnih primerov na dodatnih 116 000 na leto, pa tudi visoke finančne stroške, 32 milijonov dolarjev za medicinske stroške in kar 385 milijonov dolarjev izgube zaradi zmanjšane produktivnosti. Signal, ki sproži artemisinin je pojav prostega železa (Fe(II)) v eritrocitih, okuženih s plazmodiji. Ta aktivira peroksidni most v artemisininu, kar povzroči tvorbo ROS in uničenje celice.<sup>8</sup> Artemisinin se uporablja tudi proti raku, saj lahko zaradi močno povečane proliferacije celic, zaradi katere se poveča metabolizem železa, tudi v rakavih celicah najdemo veliko več prostega železa kot v zdravih celicah, kar omogoča visoko selektivnost artemisinina.<sup>9</sup> Podoben učinek je moč doseči tudi preko apoptoze, ki jo sproži dimerizacija kaspaze 8. Obstajajo proteini, ki se lahko dimerizirajo ob prisotnosti prostega železa. Takšen je na primer protein AcnB (*E. coli*), ki ob prisotnosti železa tvori homodimer.<sup>10</sup> Če oblikujemo protein AcnB, na katerega je pritrjena kaspaza 8, se bo ta ob dimerizaciji v prisotnosti železa prav tako dimerizirala in sprožila apoptozo celice. Še večja selektivnost je omogočena s pomočjo proteina VAR2CSA, ki ga izraža okuženi eritrocit.<sup>11</sup> Ta protein se veže na sladkorno molekulo OCS, ki jo izraža placenta in pa mnogo malignih celic.<sup>11</sup><sup>12</sup> Če se nedimerizirane konstrukte AcnB in kaspaze 8 mikroinkapsulira v vezikel, ki ima v membrani vključen OCS se bo vezikel zlil specifično z okuženim eritrocitom, če pa se jih mikroinkapsulira v vezikel, ki ima v membrani vključen VAR2CSA, se bo zlil specifično z maligno celico in v obeh primerih povzročil apoptozo. Oba vezikla morata vsebovati tudi v-SNARE proteine, ki so nujni za endocitozo. Še večja selektivnost je omogočena pri tarčenju tumorjev. CmrA je protein, ki se veže na kaspazo 8 in tako preprečuje apoptozo. V prej omenjeni vezikel lahko poleg konstrukta s kaspazo vključimo tudi dimerizirani CC, kjer vsak posamezni heliks nosi del CmrA, ki je tako aktiven in zaustavlja apoptozo, ko se zlije s celico. V bližino tumorja pa lahko vstavimo tudi mikrokapsulo s celicami, omenjenimi v drugem pristopu. Tako lahko v vibracijami specifično izberemo območje kapsule in tumorja in v enkapsuliranih celicah sprožimo sproščanje lokalnega mediatorja, ki v tumorskih celicah sproži fosforilacijo CC, ki se tako razklene in prepreči delovanje antiapoptoznega CmrA, zato poteče apoptozo. Ta pristop omogoča veliko selektivnost in varnost, saj se prepričamo da so celice rakave na 3 različne načine. Alternativni pristop pa je lahko že testirani TEV razcepljeni protein namesto kaspaze 8, saj aktivira kaspazo 3, ki prav tako vodi v apoptozo. Inhibitor v tem primeru je specifični IAP (XIAP, cIAP1 and cIAP2).<sup>13</sup>

## MOŽNE TEŽAVE

V vsakem znanstvenoraziskovalnem delu obstaja možnost težav in nepričakovanih ovir. Projekt ima mnogo delov, ki morajo delovati skupaj, težave pa se lahko pojavijo pri vsakem izmed njih. Možno je nedelovanje konstruktov (predvsem, če se jih spotoma ne preverja s sekvenciranjem) in neuspešnost transfekcije. Ena izmed predvidenih težav bi se lahko pojavila pri oblikovanju CC, saj gre za oblikovanje de novo, zaradi česar delovanje ni nujno zagotovljeno. Nekoliko vprašljiva je možnost oblikovanja CC, ki se ob fosforilaciji razmaknejo, saj naj bi se pred fosforilacijo povezovala arginin in glutaminska kislina, na nekaterih mestih pa treonin, ki ni nabit in ima zato manj možnosti, da se poveže z glutaminsko kislino. Verjetno bo potrebnih več poskusov, da se najde ravno pravilno razmerje med vsebovanim treoninom in glutaminsko kislino za optimalno delovanje. Hkrati je vprašljivo, koliko CC parov bo možno ustvariti. Na d mestu mora biti v vsakem primeru glicin, na e mestu pa glicin ali alanin. Različni pari CC se lahko tvorijo na podlagi specifičnih kombinacij glicina in alanina na heptadah. Ker pa gre v obeh primerih za majhno, nenabito aminokislino, je možnost selektivne vezave nekoliko manjša, kar pomeni, da bo možno število nastalih parov CC relativno majhno.

## METODE

Potrebni geni so lahko v celice vstavljeni s pomočjo virusnih vektorjev ali pa preko sistema CRISPR/Cas. Tako se konstrukte najprej pripravi v plazmidu, kar bo v vsakem primeru nujno, ko bo treba konstrukte poslati v ZDA.

### Priprava modificiranega kanala

Raziskovalna skupina je že pripravila modificiran TRPV1 1 in ga optimizirala. Najboljši odziv je prisoten, če je ferin pritrjen na kanal preko GFP proteina, ki je pritrjen na njegov N-terminus in se povezuje na kanal s pomočjo domene za vezavo GFP, ki je dodan na N-terminus kanala. Samo sekvenco kanala je možno poiskati in sintetizirati, možna pa je tudi povezava z katero izmed drugih skupin, ki imajo gen že v plazmidu (v zgornji raziskavi so ga dobili z univerze Duke), saj je povezovanje z drugimi skupinami nujni sestavni del tekmovanja iGEM. Na N-terminus je kot že omenjeno treba dodati tudi gen za domeno za vezavo GFP, za ferin pa je potreben fuzijski protein lahke in težke verige mišjega ferina, med seboj povezan s FLAG sekvenco in z dodanim genom za GFP na N-terminusu lahke verige. Nujno je sprotno preverjanje z metodami PCR in AGE (preverjanje primerne dolžine konstruktov), priporočljivo pa tudi s sekvenciranjem. Preverjanje uspešnosti je možno tudi s metodami imunohistokemije, s specifičnimi protitelesi proti poljubnim delom konstruktov (npr. GFP, FLAG).

### Priprava CaM-kinaze in substrata za specifično vezavo

Tudi v tem primeru je raziskovalna skupina že poskrbela za optimizacijo. 3 Pri izbranem substratu je potrebna umestitev SH3 domene na C-terminus, na kinazi pa RxxK, motiv za vezavo, na C-terminusu. Geni so človeški in so lahko sintetizirani ali pa pridobljeni z metodo PCR, s PCR, AGE in sekvenciranjem pa se lahko preverja tudi ustreznost konstruktov med načrtovanjem. Na konstrukte se lahko pritrudi tudi His oznaka, kar omogoča preverjanje izražanja v celicah s SDS-PAGE in prenosom Western.

### Oblikovanje CC

Konstrukte se da ponovno sintetizirati ali pa kupiti sintetične peptide. Sekundarno strukturo, specifičnost vezave in stabilnost je možno preveriti z izključitveno kromatografijo, SD in temperaturno denaturacijo.

### Konstrukti CC in razcepljenih proteinov

Konstrukte se da ponovno sintetizirati, a se razlikujejo med seboj. Konstrukt z na novo ustvarjenimi CC, ki naj bi se vezali v odvisnosti od fosforilacije, je treba pripraviti s povezovalno sekvenco in sekvenco dela razcepljenega proteina. Konstrukte s CC, ki so bili že oblikovani na KI, pa je treba pripraviti tako, da bodo avtoinhibitorni in da bo možna prekinitvev inhibicije s proteazami. Oba dela CC je treba torej vezati enega za drugim s primerno sekvenco, ki jo lahko specifična proteaza prereže, dele razcepljenih proteinov pa izmenično vezati na en ali drug del CC. Pri obeh je možna tudi vezava His oznake, s katero se preko SDS-PAGE in prenosa Western preverja izražanje v celicah. Preverja se lahko tudi uspešnost dimerizacije.

## Uspešnost dimerizacije

Kot dokaz principa lahko delujejo CC polipeptidi, na katere je vezan razcepljeni GFP protein, drugi fluorescenčni proteini ali luciferaza različnih vrst (npr kresničkina in *Renilla*). Na ta način je možno uspešnost dimerizacije in povezave med razcepljenimi proteini spremljati s fluorescenčnim mikroskopom, luminometrom in pretočno citometrijo.

## Aplikacija

Možnost zgoraj opisane enostavne aplikacije je tudi testiranje na rakavih celicah in pa celicah z malarijo, ki jih je moč pridobiti od Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

## VIRI

1. Stanley SA, Sauer J, Kane RS, Dordick JS, Friedman JM. Remote regulation of glucose homeostasis in mice using genetically encoded nanoparticles. *Nat Med*. 2015 Jan;21(1):92-8. doi: 10.1038/nm.3730. Epub 2014 Dec 15. Erratum in: *Nat Med*. 2015 May;21(5):537. PubMed PMID: 25501906.
2. Shekhawat SS, Ghosh I. Split-protein systems: beyond binary protein-protein interactions. *Curr Opin Chem Biol*. 2011 Dec;15(6):789-97. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.10.014. Epub 2011 Nov 7. Review. PubMed PMID: 22070901; PubMed Central PMCID: PMC3237955.
3. Kobashigawa Y, Naito M, Inagaki F. An efficient method for protein phosphorylation using the artificially introduced of cognate-binding modules into kinases and substrates. *J Biotechnol*. 2007 Sep 30;131(4):458-65. Epub 2007 Aug 14. PubMed PMID: 17875337.
4. Szilák L, Moitra J, Vinson C. Design of a leucine zipper coiled coil stabilized 1.4 kcal mol<sup>-1</sup> by phosphorylation of a serine in the e position. *Protein Sci*. 1997 Jun;6(6):1273-83. PubMed PMID: 9194187; PubMed Central PMCID: PMC2143729.
5. Poluektova LY, Huggler GK, Patterson EB, Khan MM. Involvement of protein kinase A in histamine-mediated inhibition of IL-2 mRNA expression in mouse splenocytes. *Immunopharmacology*. 1999 Feb;41(2):77-87. PubMed PMID: 10102790.
6. Gradišar H, Jerala R. De novo design of orthogonal peptide pairs forming parallel coiled-coil heterodimers. *J Pept Sci*. 2011 Feb;17(2):100-6. doi: 10.1002/psc.1331. Epub 2010 Dec 28. PubMed PMID: 21234981.
7. Shekhawat SS, Porter JR, Sriprasad A, Ghosh I. An autoinhibited coiled-coil design strategy for split-protein protease sensors. *J Am Chem Soc*. 2009 Oct 28;131(42):15284-90. doi: 10.1021/ja9050857. PubMed PMID: 19803505; PubMed Central PMCID: PMC2783329.
8. Meshnick SR, Thomas A, Ranz A, Xu CM, Pan HZ. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Dec;49(2):181-9. PubMed PMID: 1775162.
9. Maria P. Crespo-Ortiz and Ming Q. Wei, "Antitumor Activity of Artemisinin and Its Derivatives: From a Well-Known Antimalarial Agent to a Potential Anticancer Drug," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 247597, 18 pages, 2012. doi:10.1155/2012/247597
10. Tang Y, Guest JR, Artymiuk PJ, Green J. Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation. *Mol Microbiol*. 2005 Jun;56(5):1149-58. PubMed PMID: 15882410.

11. Clausen TM, Christoffersen S, Dahlbäck M, Langkilde AE, Jensen KE, Resende M, Agerbæk MØ, Andersen D, Berisha B, Ditlev SB, Pinto VV, Nielsen MA, Theander TG, Larsen S, Salanti A. Structural and functional insight into how the Plasmodium falciparum VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria. *J Biol Chem*. 2012 Jul 6;287(28):23332-45. doi: 10.1074/jbc.M112.348839. Epub 2012 May 8. PubMed PMID: 22570492; PubMed Central PMCID: PMC3390611.
12. Salanti A, Clausen TM, Agerbæk MØ, Al Nakouzi N, Dahlbäck M, Oo HZ, Lee S, Gustavsson T, Rich JR, Hedberg BJ, Mao Y, Barington L, Pereira MA, LoBello J, Endo M, Fazli L, Soden J, Wang CK, Sander AF, Dagil R, Thrane S, Holst PJ, Meng L, Favero F, Weiss GJ, Nielsen MA, Freeth J, Nielsen TO, Zaia J, Tran NL, Trent J, Babcook JS, Theander TG, Sorensen PH, Daugaard M. Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein. *Cancer Cell*. 2015 Oct 12;28(4):500-14. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.003. PubMed PMID: 26461094.
13. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. 1998 Apr 15;17(8):2215-23. PubMed PMID: 9545235; PubMed Central PMCID: PMC1170566.