

# Viralna inhibicija puteva apoptoze

---

**Mijošek, Vedrana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2010**

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:860662>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek



# VIRALNA INHIBICIJA PUTEVA APOPTOZE

## VIRAL INHIBITION OF APOPTOTIC PATHWAYS

### Seminarski rad

STUDENTICA: Vedrana Mijošek

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

MENTOR: doc.dr.sc. Maja Matulić

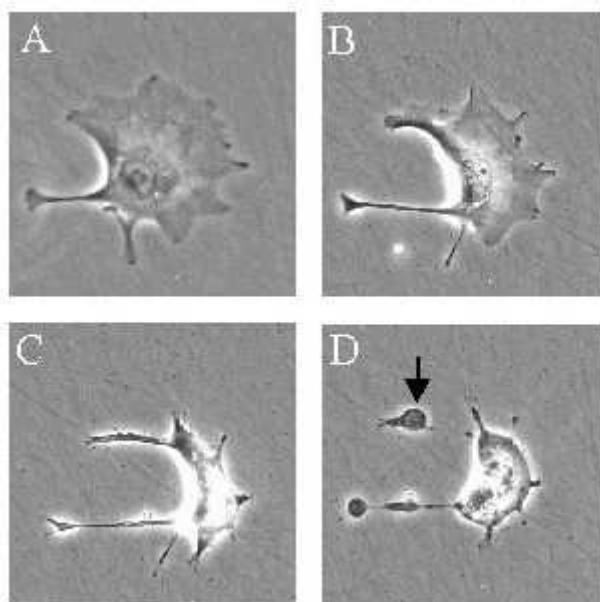
Zagreb, 2010.

## **Sadržaj:**

1. UVOD .....	3
2. MEHANIZMI APOPTOZE .....	4
2.1. Kaskada kaspaza .....	4
2.2. Vanjski ili put „receptora smrti“ .....	5
2.3. Unutarnji ili mitohondrijski put .....	8
3. VIRALNE STRATEGIJE INHIBICIJE APOPTOZE .....	11
3.1. Viralni proteini Bcl-2 .....	11
3.2. Signalni medijatori (TNF i Fas) .....	14
3.3. Medijatori puta posredovanog interferonom.....	16
3.4. Supresori kaspaza.....	16
3.5. Virusi kao manipulatori stani nog ciklusa.....	17
3.6. Regulatori oksidativnog stresa .....	17
3.7. Protein kinaze.....	17
3.8. Transkripcijski modifikatori .....	18
4. ZAKLJU AK .....	18
5. LITERATURA.....	19
6. SAŽETAK.....	21
7. SUMMARY .....	22

## 1. UVOD

Apoptoza je vrsta programirane stani ne smrti – kontroliranog aktivnog fiziološkog procesa nužnog kod embrionalnog razvoja, održavanja homeostaze te eliminaciji ošte enih stanica jednostani nih i mnogostani nih organizama. Morfološke i biokemijske promjene karakteristi ne za apoptozu su kondenzacija kromatina, disfunkcija mitohondrija te aktivacija stani nih proteaza i nukleaza s posljedi nom razgradnjom DNA (Sl.1.). Naposlijetku, ono što je preostalo od stanice su apoptoti ka tjelešca koja bivaju odstranjena profesionalnim fagocitima. Za razliku od nekroze, apoptoza ne uzrokuje proizvodnju medijatora upale i op enito upalne promjene.



**Slika 1.** Stanica se po inje sužavati nakon ega slijedi cijepanje lamina i aktinskih filamenata citoskeleta (A). Razaranje kromatina u jezgri esto vodi kondenzaciji jezgre i u mnogo slu ajeva stanice u apoptosi poprimaju oblik potkove (B). Stanice se nastavljaju sužavati (C), pakiraju i se u oblik koji omogu ava uklanjanje makrofazima. Da bi potaknule fagocitozu makrofazima, stanice u apoptosi esto karakteriziraju promjene u plazma membrani koje zapo inju odgovor makrofazima. Jedna takva promjena je translokacija fosfatidilserina iz unutrašnjeg sloja u vanjski sloj membrane. Krajnje stadije apoptoze karakterizira pojava membranskih mješuri a (D). Tako er se mogu primjetiti malene vezikule, apoptoti ka tjelešca. (D, strelica) (preuzeto s: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>)

U stanicama sisavaca, apoptoti ki procesi su podijeljeni na dva glavna puta odvijanja: vanjski put (aktiviran proapoptoti kim receptornim signalima na stani noj površini) i unutarnji put (narušavanje integriteta mitohondrijske membrane).

Poremeći u regulaciji apoptoze imbenici su mnoštva patoloških stanja. Obzirom na važnu ulogu apoptoze u djelovanju imunološkog sustava, virusi su razvili mnogobrojne mehanizme kojima ometaju njezin proces i time osiguravaju uspješno razmnožavanje i širenje. Sprjeavanjem ili odgodom apoptoze, produljuju si raspoloživi vremenski period za proizvodnju novih viriona prije nego putevi biosinteze stanice doma ina budu upozorenji. S druge strane, oni eni genski proizvodi virusa djeluju kao induktori apoptoze, vjerojatno s ciljem otpuštanja i širenja viriona iz inficirane stanice doma ina bez poticanja imunološkog odgovora. Iz navedenoga, jasno je da su virusi morali razviti raznovrsne strategije inhibicije, odnosno promocije apoptoze.

## 2. MEHANIZMI APOPTOZE

U sisavaca su opisana dva glavna puta programirane stani ne smrti – unutarnji i vanjski, a oba rezultiraju aktivacijom izvršnih proteolitičkih enzima – kaspaza. Vanjski put karakterizira apoptoza pokrenuta putem „receptora smrti“, a unutarnji ovisi o općem metabolizmu stanju stanice i signalima prenošenim kroz mitohondrije. Oba su puta povezana komunikacijom u okviru cijepanja proteina Bid – proapoptotičkog pripadnika porodice Bcl-2 proteina.

### 2. 1. Kaskada kaspaza

Proces apoptoze je pažljivo reguliran, uključujući i aktivnu kaskadu molekularnih događaja. Morfološke promjene prisutne prilikom apoptoze posljedica su djelovanja cisteinil-aspartat specifičnih proteaza – kaspaza. One su u stanicama prisutne inaktivne, u obliku proenzima. Tijekom proteolitičkog procesiranja, aktiviraju se sljedeći u kaspazu u nizu, pojavujući na taj način signalizacijski put apoptoze te konakno uzrokujući smrt stanice. Do sada je identificirano 14 kaspaza, od kojih je 11 prisutno u sisavcima. Prema svojim ulogama u signalnim putevima, podijeljene su na kaspaze koje potiču u upalu (kaspaze 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) i na kaspaze koje potiču u apoptozu. Posljednje se još dijele na inicijatorske (2, 8, 9, 10) i efektorske (3, 6, 7) kaspaze.

Malo je poznato o nekim proupalnim kaspazama, poput kaspaze 11 za koju se smatra da regulira apoptozu i sazrijevanje citokina tijekom septi kog šoka (Kang i sur., 2002); kaspaze 12 koja posreduje u apoptizi povezanoj s procesima u endoplazmatskoj mrežici; kaspaze 13 koja je na ena samo u stoki te kaspaze 14 koja je visoko eksprimirana u embrionskim tkivima.

Kaspaze modulira nekoliko endogenih stani nih faktora, uklju uju i proteine inhibitore apoptoze (IAP). Ti polipeptidi imaju aminoterminalnu domenu BIR (engl. *baculovirus inhibitor repeat*) koja se veže i inhibira funkciju kaspaza. U sisavaca postoji osam proteina koji sadrže domenu BIR (BIRPs) koji uklju uju inhibitore apoptoze 1 i 2 (IAP1 i IAP2), X-vezuju i inhibitor apoptoze (XIAP), survivin, neuronalni inhibitor apoptoze (NIAP) te enzim s ponavljam im domenama BIR i konjugiranim ubikvitinom (BRUCE) (Deveraux i sur., 1999). Livin, poznat i kao ML-IAP (engl. *melanoma-specific inhibitor of apoptosis protein*), noviji je lan porodice IAP. Recentnije studije pokazuju ekspresiju ML-IAP-a u nekim tumorskim stanicama i fetalnim tkivima. Apoptiza se regulira odvajanjem proteina Smac od ML-IAP-a onemogu avaju i ga da antagonizira inhibiciju kaspaza posredovanu XIAP-om (Vucic i sur., 2005).

## 2. 2. Vanjski ili put „receptora smrti“

Vanjski je put apoptoze iniciran stimulacijom transmembranskih receptora smrti specifi nim ligandima koje otpuštaju druge stanice. Receptori smrti mogu pripadati porodici proteina TNF (engl. *tumor necrosis factor*) koja je sastavljena od mnogo lanova. Pripadnici porodice proteina TNF sadrže ekstracelularnu subdomenu bogatu cisteinom koja im omogu ava specifi no prepoznavanje liganada te citoplazmatsku domenu od otprilike 80 aminokiselina zvanu domenom smrti (engl. *death domain - DD*) koja ima klju nu ulogu u prijenosu signala smrti sa stani ne površine prema intercelularnim putevima.

Poznato je šest receptora smrti: TNF receptor 1 (TNF-R1, poznat i kao DR1, p55, p60 ili CD120a), Fas (DR2, CD95 ili APO-1), DR3 (Apo-3, LARD, TRAMP ili WSL1), TRAIL-R1 (DR4 ili Apo-2), TRAIL-R2 (DR5, KILLER ili TRICK2) i DR6 (Suliman i sur., 2001).

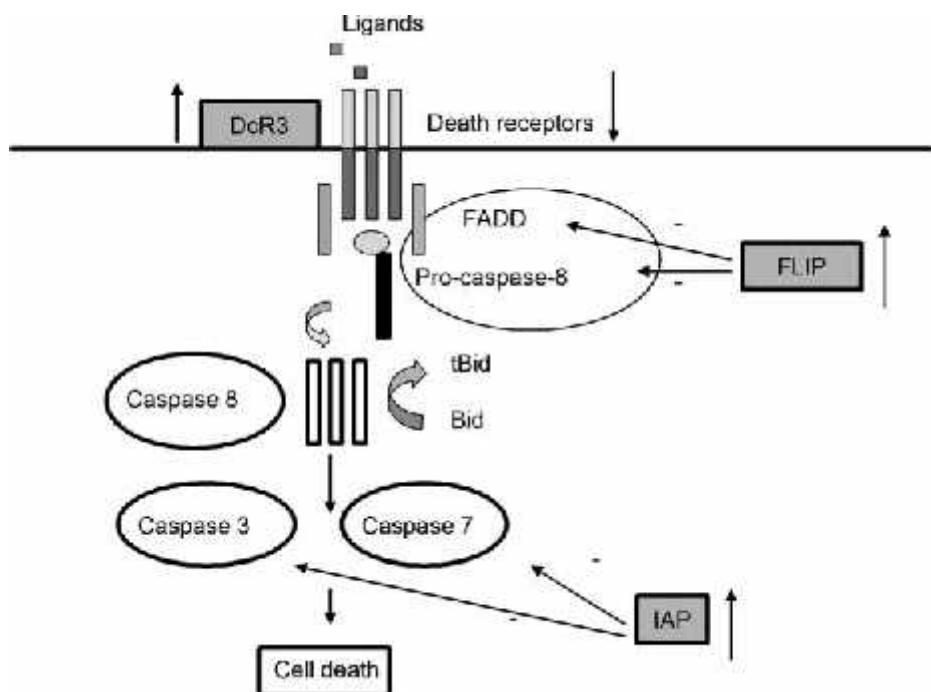
Vanjski signalni put prijenosa zapo inje vezanjem receptora smrti s njihovim specifičnim ligandima (FasR/FasL, TNFR1/TNF<sub>α</sub>, DR-4/TRAIL, DR-5/TRAIL, DR3/Apo-3L/TWEAK). Jednom kad su aktivirane, unutarstani ne se domene navedenih receptora (DD) vežu na protein adaptor FADD (engl. *Fas – associated death domain*) ili TRADD (engl. *TNFR1 – associated death domain protein*) te tvore kompleks koji inducira smrt (engl. DISC – *death inducing complex*) s uključenjem prokaspaze 8. Ona se proteolitički cijepa što rezultira njenom aktivacijom te tako služi kao inicijatorska kaspaza koja dalje aktivira sljedeće u nizu – efektorne proteine, poput kaspaza 3 i 7 da bi započela razgradnju stanice, uzrokujući i na taj način neizbjegljivu apoptozu.

Dva tipa intracelularne signalizacije su definirana za vanjski put apoptoze koje karakteriziraju generacija visoke (tip I) ili niske (tip II) razine DISC i aktivacija kaspaze 8 nakon receptorske stimulacije. U tipu I, stimulacija kaspaze 8 je dovoljna da aktivira efektorske kaspaze i inducira apoptotnu smrt. Za razliku od toga, kod tipa II, potrebna je daljnja amplifikacija, gdje aktivna kaspaza 8 cijepa protein BID u tBID, koji se može vezati na proapoptotne proteine BAX i BAK, rezultirajući i propusnošću mitohondrijske membrane i otpuštanjem mitohondrijskih proteina citokroma c i DIABLO (Ozoren i El-Deiry, 2002).

TRAIL (eng. *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) može inicirati apoptozu direktnom aktivacijom kaspaza, kao prethodno spomenuto, ili indirektno otpuštanjem apoptogena iz mitohondrija. Nedavna istraživanja ukazuju da je mitohondrijski apoptotni put inducirani TRAIL-om potenciran fosfolipidima sklamblazama-3 (Ndbele i sur., 2008). Fosfolipidi skramblaze (PLS) su enzimi koji imaju bitnu ulogu u bidirekcionalmu kretanju membranskih lipida, koji su ključni u posredovanju apoptoze u mnogim tipovima stanica. PLS3 je fosfolipid skramblaza iz mitohondrija koja olakšava promjene u lipidima mitohondrijske membrane koji promoviraju otpuštanje apoptotnih faktora te tako aktivaciju kaspaze 9 i efektorske kaspaze 3.

Put receptora smrti reguliran je na različitim razinama. Prvo, ekspresija receptora smrti varira među različitim tipovima stanica u različitim fazama razvoja. Primjerice, DR4 i DR5 se ekspresiraju u normalnom adultnom timusu i u različitim tumorskim stanicama, no ne i u drugim normalnim tkivima. Signalni putevi DR3 i DR6 su slabije karakterizirani. DR3 može kostimulirati T-stanice, ali njegova uloga u induciranju apoptoze je nejasna (Meylan i sur., 2008). Drugo, neke stanice ekspresiraju tzv. "receptore mamce", varljive stani ne površinske ili izlučivane proteine koji vežu receptore smrti s visokim afinitetom, ali nisu u mogućnosti prenijeti signale citoplazmatskim adaptorskim molekulama (Ashkenazi i sur., 1999). Jedan od

najvažnijih takvih proteina mamaca jest DcR3. Tako je poznat i kao TR6 ili M68, DcR3 je član proteinske porodice TNF i može se vezati na Fas ligand da bi inhibirao njegovu sposobnost izazivanja apoptoze. Treći mehanizam inhibiranja signalizacije receptorima smrti ulju uje nizvodnu regulaciju prokaspaze 8. Na primjer, ubikvitinski c-FLIP polipeptid sadrži prodomenu sličnu onoj prokaspaze 8, ali mu nedostaje kaspazno aktivno mjesto (Sl.2.).



**Slika 2.** Vanjski put apoptoze i njegova regulacija. Receptori smrti mogu biti regulirani na nekoliko različitih razina uključujući: prekomjernu ekspresiju receptora „mamaca“, smanjenu ekspresiju receptora smrti, prekomjernu ekspresiju molekula IAP koje mogu inhibirati aktivnost kaspaze 3 i 7, ili prekomjerna ekspresija staničnih ili viralnih molekula FLIP koje se mogu vezati na domene efektora smrti FADD i spriječiti aktivaciju prokaspaze 8 (preuzeto iz: Burz i sur., 2009. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48, 811-821.)

Tako je, vezanje TRAILER sa svojim ligandima može rezultirati aktivacijom drugih signalnih puteva, uključujući i signalne putove fosfoinozitid 3-kinaza (PI3K)-Akt, jezgrinog faktora B (NF B) i mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK, ERK, JNK i p38). Aktivacija ovih dodatnih puteva ima proliferativni efekt koji regulira razne fiziološke procese, poput hematopoeze te aktivacije T-stanica i preživljavanja, s TRAIL-om kao bitnom molekulom u nadzoru i eliminaciji tumora (Falschlehner i sur., 2007).

## **2. 3. Unutarnji ili mitohondrijski put**

Unutrašnji signalni put, koji uklju uje mitohondrije, je obično aktiviran gubitkom signala faktora rasta ili kao odgovor na izvanstani ne letalne stimulanse, poput oštete enja DNA, oksidativnog stresa, hipoksije ili kemoterapeutika.

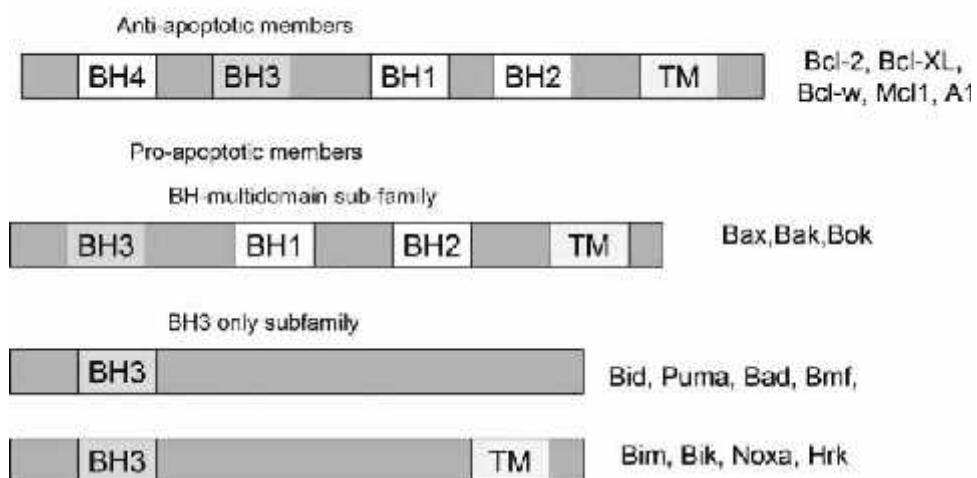
Mitohondriji, jako specijalizirani organeli, imaju vanjsku membranu (engl. *outer membrane* - OU) odvojenu od unutarnje (engl. *inner membrane* - IM) intermembranskim prostorom (engl. *intermembrane space* - IMS). Intermembranski prostor sadrži mnogo proteina uklju enih u indukciju stani ne smrti, poput citokroma c (cyt c), faktora koji induciraju apoptozu (engl. *apoptosis-inducing factors* - AIF), Omi/HtrA2, EndoG i Smac/DIABLO. Svi stimulansi koji uzrokuju promjene u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani induciraju otvaranje mitohondrijske permeabilne tranzicijske pore (engl. *mitochondrial permeability transition pore* - MPT), gubitak mitohondrijskog transmembranskog potencijala i otpuštanje odvojenih proapoptotih proteina iz intermembranskog prostora u citosol. Nakon otpuštanja u citosol, citokrom c stimulira formiranje apoptosoma (kompleksa koji uklju uje Apaf-1, dATP, citokrom c i kaspazu 9) nakon ega slijedi aktivacija kaspaze 9. Inicijator kaspaze 9 uzrokuje aktivaciju egzekucijskih kaspaza (3, 6 i 7) koje cijepaju vitalne substrate, rezultiraju i stani nom smr u (Sl.4.). Kataliti ka aktivnost citokroma c modulirana je lanovima porodice proteina inhibitora apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis protein* - IAP), koji su redom kontrolirani dvama drugim mitohondrijskim proteinima – Smac/DIABLO i OMI/HtrA2 (Cory i Adam, 2002).

Induciraju i faktor apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor* - AIF) je mitohondrijska oksoreduktaza asocirana na unutrašnjoj membrani. Tijekom apoptoze, AIF može biti otpušten proteolizom i translociran u jezgru gdje sudjeluje u kondenzaciji kromatina i fragmentaciji DNA. Novootkriveni lan porodice proteina AIF je AMID (engl. *apoptosis-inducing factor-like mitochondrion-associated inducer of death*). Unato njegovom imenu, njegova precizna lokacija u stanici i uloga tijekom apoptoze još je nerazjašnjena. Nedavne studije na humanim Jurkat T-stanicama leukemije predlažu povećanu ekspresiju te asociranje AMID-a na plazma membranu nakon indukcije apoptoze (Bilyy i sur., 2008).

Unutarnji je put kontroliran interakcijama između proapoptotnih i antiapoptotnih lanova proteinske obitelji Bcl-2. Postoji najmanje 20 proteina u Bcl-2 porodici koji su podijeljeni u 3 grupe. Grupa I podrazumijeva antiapoptotne, dok grupe II i III pripadaju proapoptotnim proteinima. Lanovi proteinske porodice Bcl-2 mogu biti definirani prisutnošću

konzerviranih sekvenci motiva poznatih kao Bcl-2 homologne domene (BH1 ili BH4). Svaka od tih domena BH ima različitu funkciju, a članovi porodice sadrže jednu ili više njih. Dok većina antiapoptotičkih proteina (uključujući i Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-xL i A1) sadrži sve četiri Bcl-2 homologne domene i štiti stanice izložene raznim citotoksičnim uvjetima, proapoptotičnim proteinima može nedostajati jedna ili nekoliko domena BH i mogu se podijeliti u 2 podgrupe. Članovi prve grupe, proteini koji sadrže samo domenu BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Noxa, Puma i Hrk) djeluju kao senzori oštete enje i direktni antagonisti Bcl-2 i drugih antiapoptotičkih proteina. Ona druga proapoptotična grupa sadrži domene BH 1-3 (Bax, Bak, Bok i Bcl-x<sub>S</sub>) i direktno aktivira ostale proapoptotične članove porodice. Antiapoptotični proteini Bcl-2 djeluju vezujući i proapoptotične članove Bax i Bak, sprečavajući oštete enje mitohondrija (Scorrano i Korsmeyer, 2003). Novi protein Bcl-2, nazvan Bcl-x<sub>AK</sub>, sadrži domene BH4 i BH2, ali nema BH3 ni BH1 (Hossini i sur., 2006). Prekomjerna ekspresija Bcl-x<sub>AK</sub> izaziva apoptozu u humanim stanicama melanoma. To je prvi protein Bcl-2 koji inducira apoptozu bez funkcionalne domene BH3 (Sl.3.).

### Bcl-2 protein family

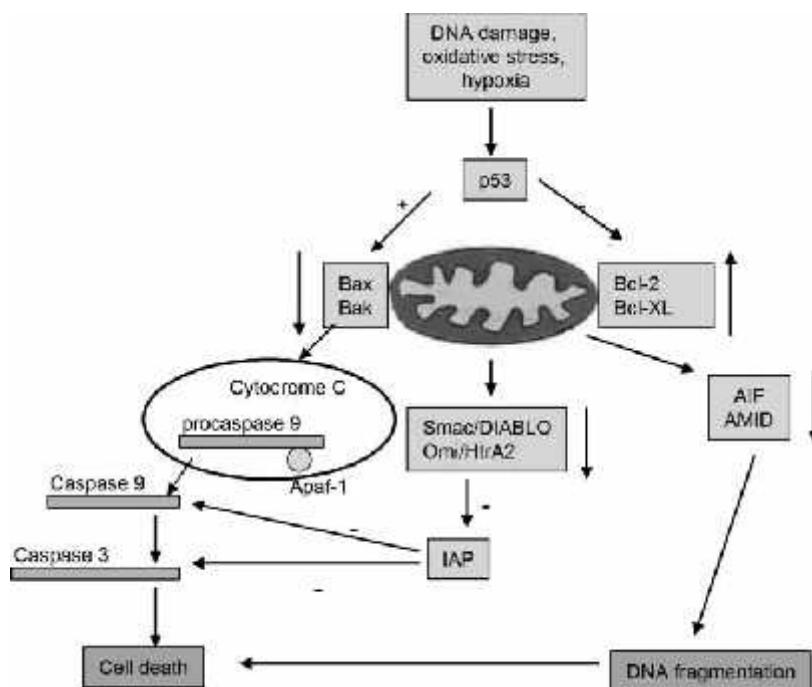


**Slika 3.** Proširena Bcl-2 porodica. Ova porodica kompromizira antiapoptotične proteine, koji dijele Bcl-2 homologne (BH) domene, i proapoptotične proteine koji sadrže domene BH1-3 ili samo domenu BH3 (preuzeto iz: Burz i sur., 2009. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48, 811-821.)

p53 je poznati tumor supresorski gen koji kodira jezgrin protein s ključnom ulogom u regulaciji stanice smrti. Kao odgovor na raznoliki stanični stres, p53 zaustavlja progresiju staničnog ciklusa kroz ekspresiju svog ciljanog gena, p21. Kad stanica ne može popraviti oštete enje DNA, p53 potiče apoptozu. Može se da p53 koristi višestruke puteve za indukciju

stani ne smrti (Dey i sur., 2008). Zna se da p53 transaktivira razne apoptoti ne faktore, poput Bax, Puma, Noxa i p53AIP1 (engl. *p53-regulated-inducing protein 1*) te da se može translocirati u mitohondrij gdje se veže na antiapoptoti ne proteine Bcl-2 i Bcl-xL. Ukoliko je p53 nefunkcionalan, stani na proliferacija može biti poreme ena.

U normalnim stanicama, MDM2 je esencijalni regulator p53. MDM2 i p53 reguliraju jedan drugoga autoregultornom povratnom spregom. U normalnim uvjetima, p53 prepisuje gene MDM2, a protein MDM2 inhibira aktivnost p53. Promotreni su mnogi modeli koji objašnjavaju inhibiciju p53 putem proteina MDM2. Prvo, MDM2 se izravno veže na N-kraj transaktivacijske domene p53 i inhibira njenu transkripciju aktivnost (Ringshausen i sur., 2006). Drugo, MDM2 funkcioniра kao E3 ubikvitin ligaza, što vodi i k iznosu p53 u citoplazmu i njegovoј proteosomalnoj degradaciji (Dey i sur., 2008).



**Slika 4.** Unutarnji put i njegova regulacija. Mitohondrijski put može biti inhibiran u razli itim fazama, uklju uju i: povišenu ekspresiju antiapoptoti kih Bcl-2 proteina, smanjene razine ekspresije proapoptoti kih Bcl-s proteina, prekomjerne ekspresije IAP proteina koji mogu inhibirati kaspazu 3 te aktivnosti kasapaza 9 i 7, smanjena ekspresija proteina AIF ili odre enih molekula eksprimiranih u mitohondriju (Smac/Diablo, Omi/HtrA2) koje reguliraju ekspresiju proteina IAP (preuzeto iz: Burz i sur., 2009. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48, 811-821.).

### **3. VIRALNE STRATEGIJE INHIBICIJE APOPTOZE**

Kao intracelularni paraziti, virusi zahtijevaju preživljavanje inficiranih stanica dovoljan vremenski period kako bi se mogli umnožiti te tako osigurati uspješnu transmisiju na sljedećeg domaćina. Viralni genomi reflektiraju specifičnu ovisnost o inhibiciji apoptoze tijekom svog životnog ciklusa, s virusnim proteinima koji djeluju na mnoge ključne korake u progresiji stanične smrti. Na razne načine djeluju tako da inhibiraju apoptozu i produljuju život stanici (npr. ekspresijom molekula nalik Bcl-2 koje djeluju antiapoptotički) ili potiču u apoptozu u drugim okolnostima (inhibicijom puteva preživljavanja).

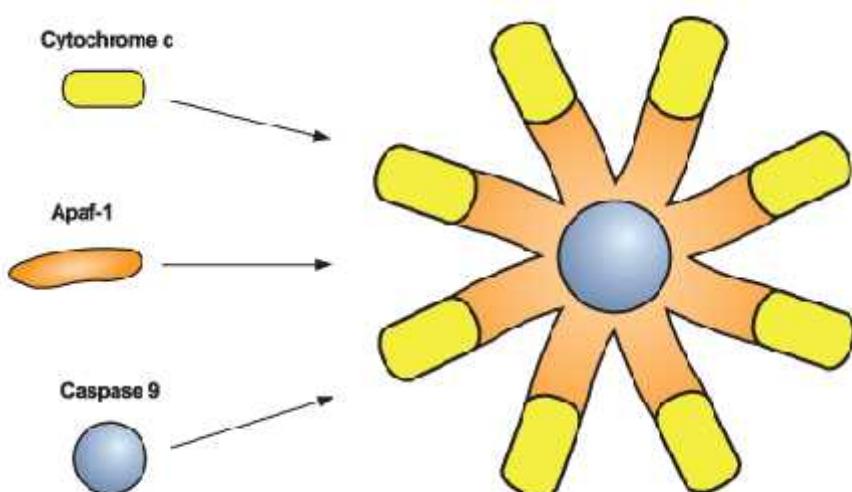
#### **3. 1. Viralni proteini Bcl-2**

Strategije održavanja integriteta mitohondrijske vanjske membrane odnose se na unutarnji put apoptoze i one su se uglavnom razvile kod DNA virusa koji kodiraju za funkcionalne homologe proteina Bcl-2, kolektivno nazvanima proteini vBcl-2. Neke su u raznim lanovima porodica *Poxviridae* (F1, N1, M11L, A179L, ORFV125, M11L), *Herpesviridae* (BHRF1, BALF1, vMIA), *Adenoviridae* (E1B19K) i *Birnaviridae* (VP5) (Galluzzi i Brenner, 2008). Zanimljivo je da dok su neki vBcl-2 proteini poput E1B19K jasni homologi staničnih proteina Bcl-2, drugi dijele malo primarne homologije s njihovim homologima u sisavaca. Međutim, kristalna struktura nekih od ovih funkcionalnih homologa Bcl-2 otkriva konzervaciju strukturalne konformacije porodice Bcl-2. Najočuvanija je domena BH3 prisutna u svim lanovima porodice proteina Bcl-2.

Proteini vBcl-2, poput i njihovih srodnika u sisavaca, variraju u svom antiapoptotskom potencijalu. Dok se proteini poput Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i E1B19K smatraju snažnim inhibitorima apoptoze, drugi poput proteina N1, Bcl-w i A1, kad su prekomjerno eksprimirani, imaju slab utjecaj na preživljavanje. Poznate su dvije međusobno kontradiktorne studije koje se odnose na usporedbu sposobnosti preživljavanja putem proteina vBcl-2 i staničnih signalnih molekula na putu preživljavanja. Procjenom različitih tipova stanica i stimulansa, Huang i sur. opisuju protein E1B19K i proliferacijski Bcl-2 u sisavaca te Bcl-X<sub>L</sub> kao funkcionalno ekvivalentne vBcl-2 i antiapoptotske proteine sisavaca, dok Cross i sur.

definiraju vBcl-2 proteine E1B19K i BHRF1 u inkovitijim inhibitorima apoptoze od njihovih homologa u sisavaca, Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>.

Nakon primljenih različitih signala za poticanje apoptoze, pro-apoptotički se lanovi porodice Bcl-2 (npr. Bad, Bid, Bax, Bak) premeštaju iz citoplazme u mitohondrijsku membranu. Tako, stvaranjem dimera, dolazi do otpuštanja citokroma c u citoplazmu, stvaranja apotosoma (Sl.5.) i aktivacije izvršnih kaspaza. Ovom se putu mogu suprotstaviti anti-apoptotički lanovi Bcl-2 porodice (npr. Bcl-2 i Bcl-XL), najvjerojatnije heterodimerizacijom s pro-apoptotičkim lanovima. Kao što je već spomenuto, vanjski (receptorom posredovani) put može komunicirati s unutarnjim kroz cijepanje Bid-a. Otcijepljeni Bid (engl. *truncated Bid*- tBid) tada ili heterooligomerizira s Bak ili Bax ili homooligomerizira unutar mitohondrijske membrane. Za otkriveni je da postoji nekoliko primjera virusne inhibicije puta apoptoze ovisnog o mitohondriju.



**Slika 5.** Elementi se okupljaju radi formiranja apotosoma (preuzeto s: <http://www.biooncology.com/research/apoptosis/pathways/intrinsic/index.html>)

Više onkogenih -herpesvirusa kao što su Epstein-Barr virus (EBV), herpesvirus povezan s Kaposijevim sarkomom (HHV-8) i herpesvirus Saimiri nose uputu za kodiranje spomenutih virusnih ortologa porodice Bcl-2 (vBcl-2), koji su sposobni inhibirati apoptozu. Antiapoptotički protein humanog CMV-a, UL37, virusni je inhibitor apoptoze lokaliziran u mitohondrijima, koji vezanjem za Bax stvara neaktivni oligomer u mitohondrijskoj membrani.

Adenovirusni protein E1B-19K inhibira apoptozu posredovanu TNF-om direktnim združivanjem s Bax te najvjerojatnije remeti funkciju tBid i blokira aktivaciju prokaspaze 9 (Perez i White, 2000). EBV proizvodi i antiapoptotki protein nazvan latentni membranski protein 1 (engl. *Latent membrane protein-1* - LMP-1) koji je važan za transformaciju rasta B limfocita. LMP-1 djeluje kao konstitutivno aktivni oblik lana porodice TNFR, CD40 i može dovesti do povećane ekspresije staničnog Bcl-2, odnosno, do smanjene osjetljivosti stanica na staničnu smrt posredovanu receptorima. Nedavna je studija pokazala da HCV glikoprotein E2 povećava dugotrajnost infekcije s HCV time što sprjećava apoptozu zaražene stanice inhibicijom otpuštanja citokroma c (Lee i sur., 2005).

**Tablica 1.** Virusni proteini i njihov učinak na apoptozu (prilagođeno i preuzeto iz: Janković i Markoti, 2007. Virusi i apoptoza. *Infektočki glasnik* 27, 63-70)

Virus	Protein	MEHANIZAM INHIBICIJE APOPTOZE/ MECHANISM OF APOPTOSIS INHIBITION
ADENOVIRUSI/ ADENOVIRUSES	E3 – 10,4	Smanjuje ekspresiju FasR/decreases expression of FasR
	E3 – 6,7	Smanjuje ekspresiju TRAIL/decreases expression of TRAIL
	E1B – 19K	Združivanjem s Bax dokida djelovanje TNF $\alpha$ /associates with Bax and inhibits TNF $\alpha$
BAKULOVIRUSI/ BACULOVIRUSES	p35, IAP	Supresija kaspaza/caspase suppression
CMV	UL – 36	Supresija kaspaza/caspase suppression
	UL – 37	Dokida djelovanje Bax-a u mitohondriju/inhibits Bax
EBV	BHFR1	Virusni ortolog Bcl-2/Bcl-2-like protein
	LMP-1	Povećava ekspresiju staničnog Bcl-2/increases expression of cellular Bcl-2
HBV	Px	Supresija p53/suppression of p53
HCV	NS5A	Inhibira prijenos signala putem TNFR1/inhibits TNFR1 signal transmission
HIV	Tat	Virusni ortolog Bcl-2/Bcl-2-like protein
HPV-16	E5	Smanjuje stvaranje DISC-a/decreases formation of DISC
	E6	Inhibira prijenos signala putem TNFR1/inhibits TNFR1 signal transmission
POXVIRUSI/ POXVIRUSES	CrmA	Inhibicija serpina/inhibition of serpins
		Virusni ortolozi TNFR2, dokidaju djelovanje TNF/TNF2-like proteins, Inhibition of TNF signal

### **3. 2. Signalni medijatori (TNF i Fas)**

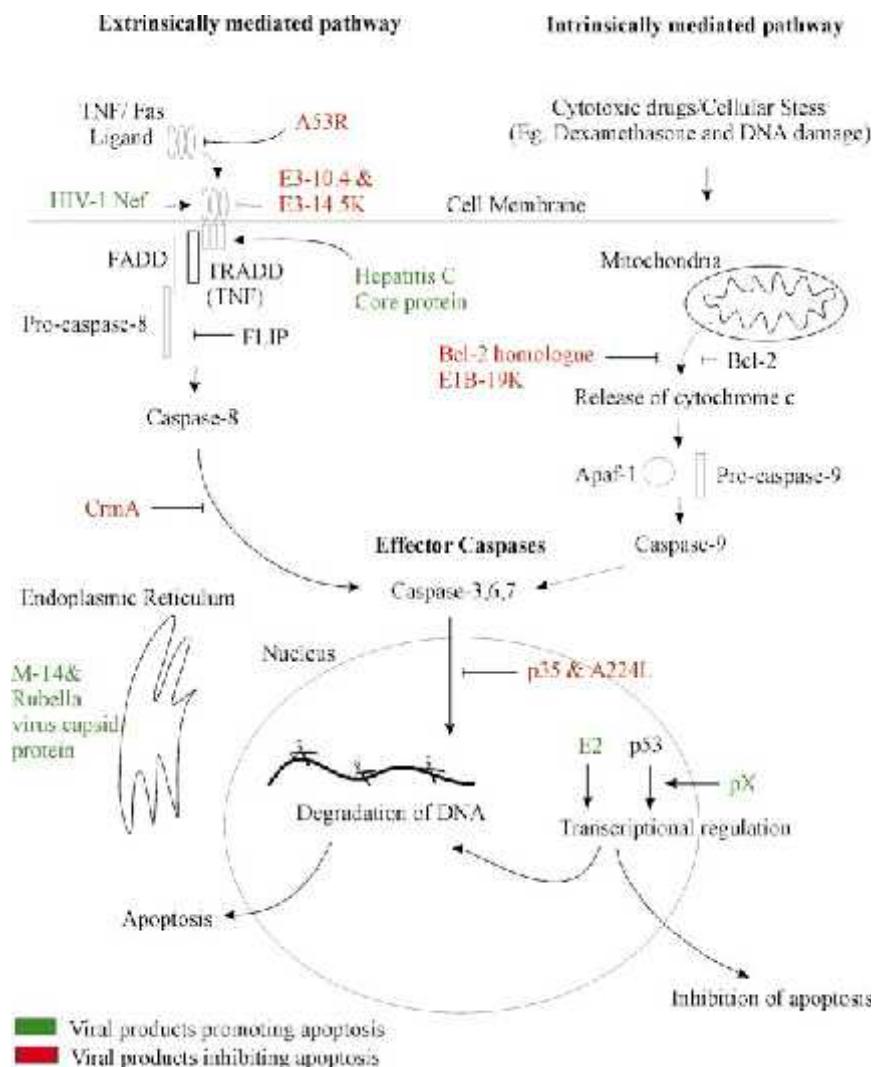
Bioraspoloživost liganada za receptore iz TNF porodice može se regulirati proizvodnjom topivih receptora mamaca koji nastaju cijepanjem i odvajanjem izvanstani nog dijela receptora od njegove unutarstani ne signalne domene ili pak proteinima sa sposobnoš u vezanja na isto vezno mjesto. Mnogi virusi iz porodice poxvirusa sadržavaju razli ite TNFR-2 ortologe koji vežu TNF i time sprje avaju stani nu smrt.

Adenovirusi pak koriste drugu strategiju – smanjuju prisutnost samih receptora za FasL i TRAIL na površini inficirane stanice (Tab.1.). Oni specifi no imaju direktni utjecaj u ranoj fazi, s proteinima E3-10.4K i E3-14.5K koji smanjuju prezentaciju molekula Fas na stani noj površini (S1.6.). Ova redukcija apoptoti kih stani nih receptora rezultira otpornoš u na stani nu smrt posredovanu Fas-om. Proteini 10.4K/14.5K dovode do protektivnog efekta protiv apoptoze posredovane TNF-om.

Pored opisanih strategija primarne obrane, usmjerenih inhibiranju me udjelovanja liganda i receptora, virusi su razvili nekoliko mehanizama blokiranja prijenosa signala nakon vezanja liganda na receptor smrti. Postoji primjer virusnih proteina koji inhibiraju FLICE/kaspazu 8 (engl. *viral FLICE inhibitory protein* - vFLIP), koji sadržavaju DED i inhibiraju aktivaciju kaspaze 8 unutar DISC-a. Genski kod za vFLIP proteine sadržavaju mnogi virusi iz porodice -herpesvirusa, kao i ljudski poxvirus te virus *Molluscum contagiosum* (MCV). Humani papilomavirus 16 (HPV-16) sadržava kod za dva razli ita proteina za koje je utvr eno da inhibiraju apoptozu na razini DISC-a. HPV-16 E5 protein inhibira apoptozu supresijom stvaranja DISC-a u stani noj liniji humanih keratinocita tretiranih s TRAIL-om, dok se E6 protein natje e s TRADD vežu i se izravno na citoplazmatski rep TNFR1 i na taj na in inhibira stani nu smrt inficiranih mišjih fibroblasta. Za protein NS5A virusa hepatitis C (HCV) pokazano je da interakcijom s TRADD inhibira ubijanje hepatocita posredovano s TNF u transgeni nim miševima. Prema ovome, regrutacija citoplazmatskih adapterskih proteina, kako bi se modulirala signalizacija putem receptora smrti, ini se uspješnom strategijom koju i koristi velika ve ina virusa.

Myxoma virusni (MYXV) protein M-T2 je virusni protein koji oponaša TNF receptor i potencijalni je inhibitor ekstracelularnog apoptoti kog puta posredovanog TNF-om. Otpušta se u obliku monomera ili dimera i veže TNF, tako zaustavlju i prijenos signala TNF receptorom. Protein tako er ima i mogu nost intracellularne supresije stani ne smrti u CD4<sup>+</sup>T limfocitima. Ta je funkcija druk ija od one vezanja ekstracelularnog TNF-a i posredovana je

prvim dvjema cisteinom bogatim domenama proteina M-T1. Virus kravljih boginja (engl. *cowpox virus* - CPV) takođe ima proteine srođene porodici receptora TNF, proteina Crm (engl. *cytokine response-modifying*) – CrmB, CrmC i CrmD. M-T2 ima sličnosti i s CrmB i s CrmD (Cunnion, 1999). Ispriča nije bilo poznato da li C-terminalna vezna regija Crm proteina TNF-ligand vezujuće domene, no pokazano je da virus vakcinije (engl. *vaccinia virus* – VV), srođan CrmC, A53R, može proizvesti TNF vezujući protein, i to topljivi i sposoban vezati TNF s visokim afinitetom, sprječavajući tako djelovanje receptora TNF u apoptozi (Alcami i sur., 1999).



**Slika 6.** Interakcija viralnih proteina s apoptotičnim putem domaćina. Viralni produkti koji inhibiraju apoptozu su prikazani crvenom bojom (preuzeto iz: Hay i Kannourakis, 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 83, 1547-1564.)

### **3. 3. Medijatori puta posredovanog interferonom**

Odgovor doma ina na virusnu infekciju uklju uje indukciju apoptoze inficiranih stanica putem leukocita. Proteini interferoni (eng. *interferon - IFN*) sudjeluju u tom procesu. Interferoni svojim potencijalom signalizacije omogu uju modulaciju imunog odgovora i stani ne proliferacije (Balachandran i sur., 2000). Zanimljiva je mogu nost interferencije ovih proteina u apoptoti kim putevima. IFN, prilikom obavljanja svoje uloge, dovodi do ekspresije bitnih stani nih gena, poput serinske protein kinaze ovisne o dvolan anoj RNA (PKR), senzibiliraju i tako stani ni sustav za indukciju smrti. Bilo koja faza virusne infekcije je osjetljiva na njezin inhibitorni kapacitet. Proteini IFN pripremaju stanice za apoptozu putem FADD-a. Neki virusi mogu svojim inhibitorima apoptoze blokirati ove puteve i omogu iti preživljavanje stanice (Ezelle i sur., 2001).

### **3. 4. Supresori kaspaza**

Virusi mogu inhibirati apoptozu i putem inhibicije kaspaza. Me u njima se nalazi i antiapoptoti ki protein humanog citomegalovirusa (CMV), UL36, koji djeluje kao virusni inhibitor aktivacije kaspaze 8 (Skaletskaya i sur., 2001). UL36 može prekinuti apoptozu pokrenutu Fas-om, ali nije homologan niti jednom poznatom stani nom proteinu. Mnogi poxvirusi nose uputu za kodiranje serpina (inhibitora serinskih proteaza) koji mogu vezati za i sprije iti djelovanje stani nih kaspaza. Bakulovirusni protein p35 inhibira kaspaze 1-4 i kaspazu 7 (Clem, 2001). Iako p35 i serpini poxvirusa mogu potisnuti signalizaciju preko receptora smrti u modelima stani nih kultura, ovi proteini imaju sposobnost blokiranja širokog spektra procesa ovisnih o proteazama te se ini da imaju i višestruke funkcije u promicanju virusnog umnožavanja *in vivo*.

Drugi antiapoptoti ki bakulovirusni protein je IAP. Proteini sisavaca koji su mu srodni uklju uju XIAP, c-IAP1, c-IAP2 i survivin. Gen virusa ASFV-a, A224L, proizvodi protein srođan viralnom proteinu IAP koji reagira s kaspazom 3 i suprimira njenu aktivnost (Nogal i sur., 2001).

### **3. 5. Virusi kao manipulatori stani nog ciklusa**

Za razliku od ve ine navedenih kategorija, virusni regulatori stani nog ciklusa uklju uju i inhibitore i induktore apoptoze. Veliki antigen T kojeg eksprimira Simian virus 40 (SV40) je dobar primjer budu i da ima oba svojstva. Inhibicija apoptoze vezana je za sposobnost vezanja tumor supresorskog proteina p53 i pRb. Veliki T antigen tako može suprimirati apoptozu inducirano kaspazom 1 putem ovisnim o p53. S druge strane, veliki T antigen u nekim tipovima stanica može inducirati apoptozu, a taj proces može modulirati mali t antigen (Kolzau i sur., 1999).

Protein pX virusa hepatitisa B (HBV) tako er može vezati p53 da bi regulirao stani ni ciklus. Kontrolirana ekspresija ovog proteina modulira apoptozu ovisnu o p53. Dok porast u produkciji proteina pX inducira apoptozu, njegova smanjena proizvodnja inhibira apoptozu.

### **3. 6. Regulatori oksidativnog stresa**

Oksidativni stres je dobro poznato lice apoptoze. Dakako, produkcija reaktivnih me uprodukata kisika i akumulacija oksidiranih stani nih spojeva igraju ulogu u posredovanju stani ne smrti. Glutation peroksidaze djeluju antioksidativno i štite stanicu od procesa oksidacije. Pokazano je da virus *Molluscum contagiosum* (MOCV) tako er može kodirati protein sli an ovom stani nom selenoproteinu. Tako virus može omogu iti stanicu preživljavanje okolišnog stresa i posljedice oksidacije (Shisler i sur., 1998).

### **3. 7. Protein kinaze**

U<sub>S</sub>3, virusni gen koji kodira antiapoptotiski protein, produkt je virusa *Herpes simplex* (HSV) koji funkcioniira kao serinska kinaza da bi se blokirala apoptozu inducirana virusima. U<sub>S</sub>3 sura uje s U<sub>S</sub>5 u supresiji apoptoze inducirane Fas receptorom ili UV zra enjem. U<sub>S</sub>5 se ini bitnjim za inhibiciju apoptoze posredovane Fas-om od U<sub>S</sub>3 (Jerome i sur., 1999).

### **3. 8. Transkripcijski modifikatori**

Za o ekivati je, ukoliko virusi imaju sustav potreban za utjecanje na stani no preživljavanje i stani nu smrt, da imaju i sredstva za regulaciju transkripcije. Osim što mogu utjecati na stani no preživljavanje i inhibiciju stani ne smrti, virusi mogu utjecati na stani nu sudbinu i na razini transkripcije. Tako u produktivnom životnom ciklusu papilomavirusa protein E2 ima ulogu transkripcijskog represora ORF E6/E7 ime se ujedno sprje ava njihovo djelovanje na pRb i p53 te vodi u apoptozu. Usporedno, E2 može i direktno poticati apoptozu aktivacijom kaspaze 8 (Blachon i Demeret, 2003).

Virus bolesti Marek tako er djeluje na transkripciju gena vezanih za apoptozu, primjerice, indukcijom Bcl-2 i represijom proteina Bax (Liu i sur., 1998).

## **4. ZAKLJUČAK**

Virusi su, kao intracelularni paraziti, ovisni o živoj stanici. Kako bi si osigurali uspješno umnožavanje i prijenos na novog doma ina, razvili su razli ite taktike preživljavanja. Virusna regulacija programirane stani ne smrti je sofisticiran proces. Ovisno o tipu virusa te fazi životnog ciklusa stanice, virus je sposoban relativno jednostavno u i u stanicu i inhibirati njezinu apoptozu na na in koji mu dopušta dovoljno vremena za razmnožavanje i infekciju drugih stanica. S druge strane, virus može zaraziti stanicu te inducirati njezinu smrt. Širenjem zaraze putem apoptoti kih tjelešaca, minimalizira se imunološki odgovor doma ina.

## 5. LITERATURA

**Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A, 2009.** Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* **48**, 811-821.

**Clem RJ, 2001.** Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death* **8**, 137–43.

**Ezelle HJ, Balachandran S, Sicheri F, Polyak SJ, Barber GN, 2001.** Analyzing the mechanisms of interferon-induced apoptosis using CrmA and hepatitis C virus NS5A. *Virology* **281**, 124-137.

**Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H, 2007.** TRAIL signalling: Decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1462-75.

**Hay S, Kannourakis G, 2002.** A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* **83**, 1547-1564.

**Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA, 2009.** *Virology* **384**(2), 324-334.

**Jankovi M, Markoti A, 2007.** Virus i apoptoza. *Infektoški glasnik* **27**, 63-70.

**Lee SH, Kim YK, Kim CS, et al., 2005.** E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *J Immunol* **175**, 8226–35.

**McCloskey TW, Ott M, Tribble E et al., 2007.** Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* **158**, 1014–19.

**Meylan T, Davidson TS, Kahle E, Kinder M, Acharya K, Jankovic D, Bundoc V, et al., 2008.** The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases. *Immunity* **29**, 79-89F.

**Ndebele K Gona P, Jin TG, Benhaga N, Chalah A, Degli-Esposti M, et al., 2008.** Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced mitochondrial pathway to apoptosis and caspase activation is potentiated by phospholipids scramblase-3. *Apoptosis* **13**,

**Postigo A, Ferrer PE, 2009.** Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. *Microbes Infect* **11**, 1071-1078.

**Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS, 2001.** A cytomegalovirusencoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7829-7834.

**Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, et al., 2007.** IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B activation, and TNF $\alpha$ dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-81.

**Vaux DL, Silke J, 2005.** IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Mol Cell Biol* **6**, 287-97.

**Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, et al., 2005.** Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: Implications for Smacdependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* **385**, 11-20.

<http://www.biooncology.com/research/apoptosis/index.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>

<http://www.genomicobject.net/member3/GONET/apoptosis.html>

<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>

## **6. SAŽETAK**

Programirana stani na smrt je orkestrirani biokemijski proces koji ultimativno završava smr u stanice. Apoptoza je najbolje opisani oblik programirane stani ne smrti. O ituje se kondenzacijom kromatina, disfunkcijom mitohondrija te aktivacijom stani nih proteaza i nukleaza pa dovodi do razgradnje DNA. Ne uzrokuje upalne promjene, što je razlikuje od nekroze. Klju na je komponenta u normalnom životu mnogostani nih organizama, sa svojom ulogom u razvoju, imunosti i održavanju homeostaze. Postoje dva glavna puta programirane stani ne smrti: unutarnji i vanjski, a oba rezultiraju aktivacijom izvršnih proteoliti kih enzima – kaspaza. Vanjski put se odnosi na apoptozu pokrenutu putem „receptora smrti“, a unutarnji ovisi o op em metaboli kom stanju stanice i integritetu mitohondrijske membrane.

S obzirom na bitnu ulogu apoptoze u imunološkom odgovoru, mnogi virusi, kao dio svog arsenala, imaju sposobnost modulacije apoptoti kih puteva doma ina. Suprotno je o ekivanom da tako jednostavnji organizmi mogu utjecati na ovako važne puteve relativno složenih stanica doma ina. No, virusi mogu inducirati ili inhibirati proces programirane stani ne smrti kroz manipulaciju klju nih apoptoti kih proteina. U ovom radu predstavljene su glavne strategije kojima se koriste virusi kako bi omeli puteve apoptoze te si na taj na in osigurali dovoljno vremena za uspješno umnožavanje i transmisiju – od kodiranja za funkcionalne homologe proteinske porodice Bcl-2 do ekspresije viralnih genskih produkata kojima utje u na regulaciju stani nog ciklusa, oksidativnog stresa, transkripciju gena vezanih za apoptozu te raspoloživost signalnih medijatora i aktivnost kaspaza.

## 7. SUMMARY

Programmed cell death is an orchestrated biochemical process that leads ultimately to the demise of the cell. Apoptosis is the best characterized form of programmed cell death. Cell changes that have been observed while undergoing apoptosis are chromatin condensation, mitochondria disruption, protease and nuclease activation finally resulting in DNA fragmentation. While necrosis often results in inflammation and adaptive immunity, no inflammatory reaction is associated with apoptosis. Apoptosis is a crucial component for normal multicellular life, playing a key role in development, immunity and the maintenance of homeostasis. There are two main apoptotic pathways: the intrinsic and extrinsic pathways which both lead to caspase (effectors proteolytic enzymes) activation. The extrinsic pathway operates via death receptors on the cell surface, whereas the intrinsic one depends on general metabolic state of cell and mitochondrial membrane integrity.

Due to great importance of apoptosis in immunity, many viruses have, as a part of their arsenal, the ability to modulate the apoptotic pathways of the host. It is counter-intuitive that such simple organisms would efficiently affect these most crucial pathways within host, given the relative complexity of the host cells. Yet, viruses have the potential to initiate or inhibit the onset of programmed cell death through the manipulation of a variety key apoptotic proteins. This seminar provides the overview of main viral strategies to inhibit the apoptotic death of the host and thus ensure the infected cell survival for the appropriate length of time in order to propagate and successfully transmit to the next host – from expressing viral Bcl-2 homologues to viral gene products that are able to interfere with cell cycle and oxidative stress regulation, control the transcription of apoptosis-related genes, influence the signaling mediators presentation on the cell surface and caspase activation.