



Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki 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 Matuli

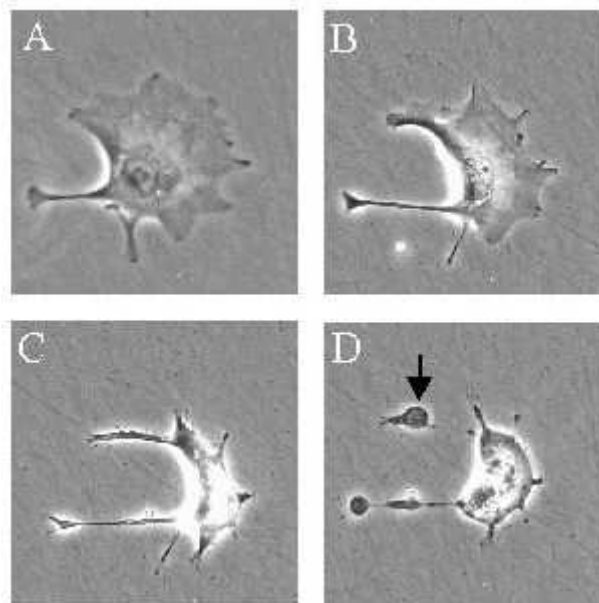
Zagreb, 2010.

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.). Naposljetku, 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 inji 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 apoptozi 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 apoptozi 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 mjehuri 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 proapoptotikim receptornim signalima na stani noj površini) i unutarnji put (narušavanje integriteta mitohondrijske membrane).

Poreme aji 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. Sprje avanjem ili odgodom apoptoze, produljuju si raspoloživi vremenski period za proizvodnju novih viriona prije nego putevi biosinteze stanice doma ina budu upozoreni. S druge strane, odre ni 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 proteoliti kih enzima – kaspaza. Vanjski put karakterizira apoptoza pokrenuta putem „receptora smrti“, a unutarnji ovisi o op em metaboli kom stanju stanice i signalima prenošenim kroz mitohondrije. Oba su puta povezana komunikacijom u okviru cijepanja proteina Bid – proapoptotikog pripadnika porodice Bcl-2 proteina.

2. 1. Kaskada kaspaza

Proces apoptoze je pažljivo reguliran, uključujući i aktivnu kaskadu molekularnih doga aja. Morfološke promjene prisutne prilikom apoptoze posljedica su djelovanja cisteinil-aspartat specifi nih proteaza – kaspaza. One su u stanicama prisutne inaktivne, u obliku proenzima. Tijekom proteoliti kog procesiranja, aktiviraju sljede u kaspazu u nizu, poja avaju i na taj na in signalizacijski put apoptoze te kona no uzrokuju i 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 poti u upalu (kaspaze 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) i na kaspaze koje poti u apoptozu. Posljednje se još dijele na inicijatorske (2, 8, 9,10) i efektorske (3, 6, 7) kaspaze.

Malo je poznato o nekim proučavanim kaspazama, poput kaspaze 11 za koju se smatra da regulira apoptozu i sazrijevanje citokina tijekom septičkog šoka (Kang i sur., 2002); kaspaze 12 koja posreduje u apoptozi povezanoj s procesima u endoplazmatskoj mrežici; kaspaze 13 koja je nađena samo u stani te kaspaze 14 koja je visoko eksprimirana u embrionskim tkivima.

Kaspaze modulira nekoliko endogenih stanih faktora, uključujući 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 uključuju inhibitore apoptoze 1 i 2 (IAP1 i IAP2), X-vezuju i inhibitor apoptoze (XIAP), survivin, neuronalni inhibitor apoptoze (NIAP) te enzimi s ponavljajućim domenama BIR i konjugiranim ubikvitinom (BRUCE) (Deveraux i sur., 1999). IAP, poznat i kao ML-IAP (engl. *melanoma-specific inhibitor of apoptosis protein*), noviji je član porodice IAP. Recentnije studije pokazuju ekspresiju ML-IAP-a u nekim tumorskim stanicama i fetalnim tkivima. Apoptoza se regulira odvajanjem proteina Smac od ML-IAP-a onemogućavajući 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 specifičnim ligandima koje otpuštaju druge stanice. Receptori smrti mogu pripadati porodici proteina TNF (engl. *tumor necrosis factor*) koja je sastavljena od mnogobrojnih članova. Pripadnici porodice proteina TNF sadrže ekstracelularnu subdomenu bogatu cisteinom koja im omogućava specifično prepoznavanje liganada te citoplazmatsku domenu od otprilike 80 aminokiselina zvanu domenom smrti (engl. *death domain* - DD) koja ima ključnu ulogu u prijenosu signala smrti sa stanih površina 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).

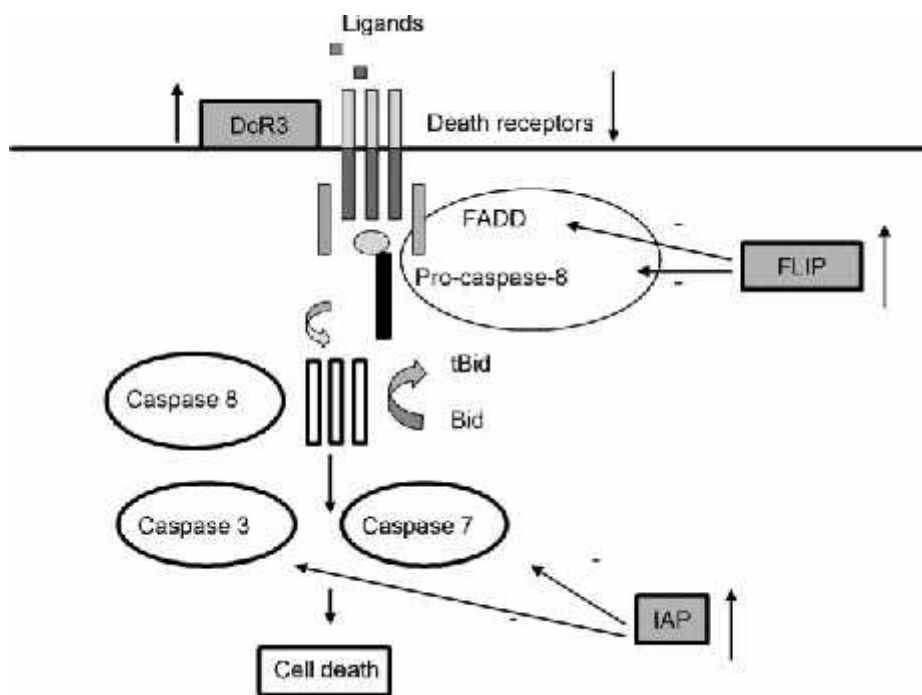
Vanjski signalni put prijenosa zapo inje vezanjem receptora smrti s njihovim specifičnim ligandima (FasR/FasL, TNFR1/TNF, DR-4/TRAIL, DR-5/TRAIL, DR3/Apo-3L/TWEAK). Jednom kad su aktivirane, unutarstanične domene navedenih receptora (DD) vežu na protein adaptor FADD (engl. *Fas – associated death domain*) ili TRADD (engl. *TNFR1 – associated death domain protein*) te tvore kompleks koji inducira smrt (engl. *DISC – death inducing complex*) s uključivanjem 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 na taj način neizbježnu 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 apoptotičnu 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 proapoptotične proteine BAX i BAK, rezultirajući u propusnošću u 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 apoptotični put inducirani TRAIL-om potenciran fosfolipidima sklamblazama-3 (Ndbele i sur., 2008). Fosfolipidi skramblaze (PLS) su enzimi koji imaju bitnu ulogu u bidirekcionalnom 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 apoptotičkih 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 ekspimiraju u normalnom adultnom timusu i u različitim tumorskim stanicama, no ne i u drugim normalnim tkivima. Signalni putevi DR3 i DR6 su slabije okarakterizirani. DR3 može kostimulirati T-stanice, ali njegova uloga u induciranju apoptoze je nejasna (Meylan i sur., 2008). Drugo, neke stanice ekspimiraju tzv. "receptore mamce", varljive stanice na 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 er poznat i kao TR6 ili M68, DcR3 je lan proteinske porodice TNF i može se vezati na Fas ligand da bi inhibirao njegovu sposobnost izazivanja apoptoze. Tre i mehanizam inhibiranja signalizacije receptorima smrti ulju uje nizvodnu regulaciju prokaspaze 8. Na primjer, ubikvitinski c-FLIP polipeptid sadrži prodomenu sli nu 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 razli itih razina uklju uju i: prekomjernu ekspresiju receptora „mamaca“, smanjenu ekspresiju receptora smrti, prekomjernu ekspresiju molekula IAP koje mogu inhibirati aktivnost kaspaze 3 i 7, ili prekomjerna ekspresija stani nih ili viralnih molekula FLIP koje se mogu vezati na domene efektor smrti FADD i sprije iti 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 er, vezanje TRAILER sa svojim ligandima može rezultirati aktivacijom drugih signalnih puteva, uklju uju i signalne putove fosfoinozimid 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 preživljenja, s TRAIL-om kao bitnom molekulom u nadzoru i eliminaciji tumora (Falschlehner i sur., 2007).

2. 3. Unutarnji ili mitohondrijski put

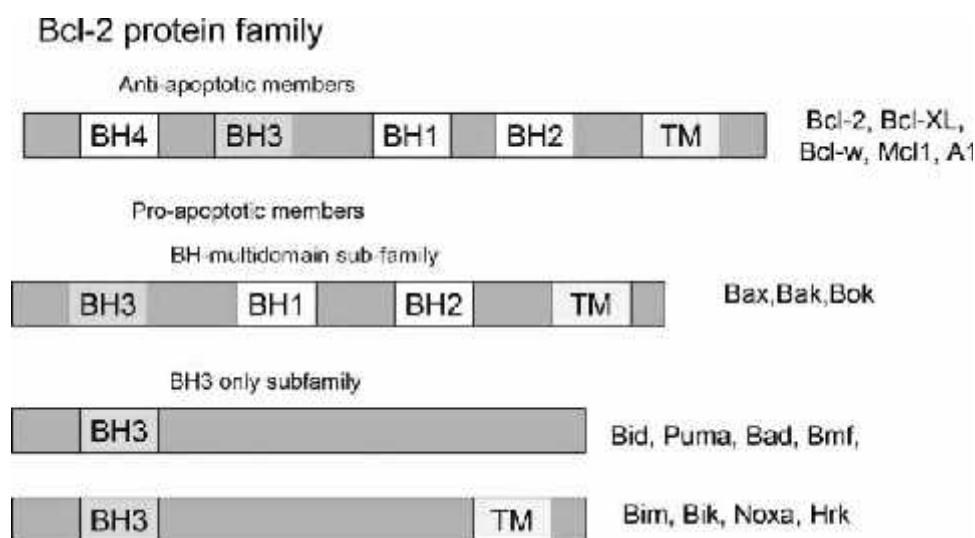
Unutrašnji signalni put, koji uključuje mitohondrije, je obično aktiviran gubitkom signala faktora rasta ili kao odgovor na izvanstanične letalne stimulacije, poput oštećenja DNA, oksidativnog stresa, hipoksije ili kemoterapeutika.

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 uključujući one u indukciji stanične 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 proapoptotičkih proteina iz intermembranskog prostora u citosol. Nakon otpuštanja u citosol, citokrom c stimulira formiranje apoptosoma (kompleksa koji uključuje Apaf-1, dATP, citokrom c i kaspazu 9) nakon čega slijedi aktivacija kaspaze 9. Inicijator kaspaze 9 uzrokuje aktivaciju egzekucijskih kaspaza (3, 6 i 7) koje cijepaju vitalne substrate, rezultirajući staničnom smrću (Sl.4.). Katalitička aktivnost citokroma c modulirana je članovima 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).

Inducirajući 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 član porodice proteina AIF je AMID (engl. *apoptosis-inducing factor-like mitochondrion-associated inducer of death*). Unatoč 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 proapoptotičkih i antiapoptotičkih članova proteinske obitelji Bcl-2. Postoji najmanje 20 proteina u Bcl-2 porodici koji su podijeljeni u 3 grupe. Grupa I podrazumijeva antiapoptotičke, dok grupi II i III pripadaju proapoptotični proteini. Članovi proteinske porodice Bcl-2 mogu biti definirani prisutnošću u

konzerviranih sekvenci motiva poznatih kao Bcl-2 homologne domene (BH1 ili BH4). Svaka od tih domena BH ima različit 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, proapoptotični 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 oštećenja i direktni antagonisti Bcl-2 i drugih antiapoptotičkih proteina. Ona druga proapoptotična grupa sadrži domene BH 1-3 (Bax, Bak, Bok i Bcl-x_s) i direktno aktivira ostale proapoptotične članove porodice. Antiapoptotični proteini Bcl-2 djeluju vezujući proapoptotične članove Bax i Bak, sprečavajući oštećenje mitohondrija (Scorrano i Korsmeyer, 2003). Novi protein Bcl-2, nazvan Bcl-x_{AK}, sadrži domene BH4 i BH2, ali nema BH3 ni BH1 (Hossini i sur., 2006). Prekomjerna ekspresija Bcl-x_{AK} izaziva apoptozu u humanim stanicama melanoma. To je prvi protein Bcl-2 koji inducira apoptozu bez funkcionalne domene BH3 (Sl.3.).

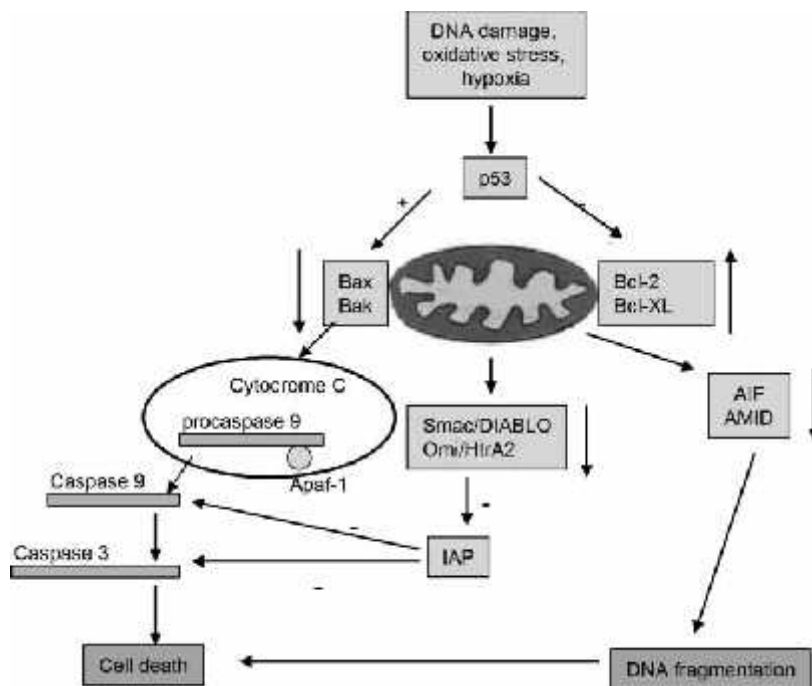


Slika 3. Proširena Bcl-2 porodica. Ova porodica kompromizira antiapoptotične proteine, koji dijele Bcl-2 homologne (BH) domene, i proapoptotične proteine koji sadrže domene BH1-3 ili samo domenu BH3 (preuzeto iz: Burz i sur., 2009. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets.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

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

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

U normalnim stanicama, MDM2 je esencijalni regulator p53. MDM2 i p53 reguliraju jedan drugoga autoregulatornom 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 transkripcijsku aktivnost (Ringshausen i sur., 2006). Drugo, MDM2 funkcionira kao E3 ubikvitin ligaza, što vodi i k iznosu p53 u citoplazmu i njegovoj proteosomalnoj degradaciji (Dey i sur., 2008).



Slika 4. Unutarnji put i njegova regulacija. Mitohondrijski put može biti inhibiran u različitim fazama, uključujući: povišenu ekspresiju antiapoptotičkih Bcl-2 proteina, smanjene razine ekspresije proapoptotičkih Bcl-s proteina, prekomjerne ekspresije IAP proteina koji mogu inhibirati kaspazu 3 te aktivnosti kaspaza 9 i 7, smanjena ekspresija proteina AIF ili određenih 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 sljedeće domaćine. 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 različite načine djeluju tako da inhibiraju apoptozu i produljuju život stanici (npr. ekspresijom molekula nalik Bcl-2 koje djeluju antiapoptotici) ili potiču apoptozu u drugim okolnostima (inhibicijom puteva preživljavanja).

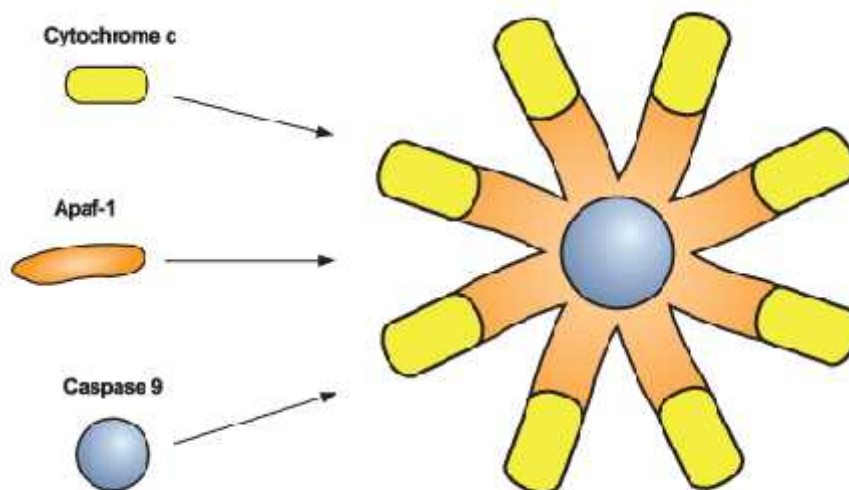
3. 1. Viralni proteini Bcl-2

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. Nađeni su u raznim članovima 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 homologe 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. Najosobnija je domena BH3 prisutna u svim članovima porodice proteina Bcl-2.

Proteini vBcl-2, poput i njihovih srodnika u sisavaca, variraju u svojoj antiapoptotičkoj potencijalu. Dok se proteini poput Bcl-2, Bcl-X_L i E1B19K smatraju snažnim inhibitorima apoptoze, drugi poput proteina N1, Bcl-w i A1, kad su prekomjerno ekspimirani, 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 preživljenja. Procjenom različitih tipova stanica i stimulansa, Huang i sur. opisuju protein E1B19K i proliferacijski Bcl-2 u sisavaca te Bcl-X_L kao funkcionalno ekvivalentne vBcl-2 i antiapoptotičke proteine sisavaca, dok Cross i sur.

definiraju vBcl-2 proteine E1B19K i BHRF1 u inkovitim inhibitorima apoptoze od njihovih homologa u sisavaca, Bcl-2 i Bcl-X_L.

Nakon primljenih različitih signala za poticanje apoptoze, pro-apoptotici koji se članovi porodice Bcl-2 (npr. Bad, Bid, Bax, Bak) premještaju iz citoplazme u mitohondrijsku membranu. Tako, stvaranjem dimera, dolazi do otpuštanja citokroma c u citoplazmu, stvaranja apoptosoma (Sl.5.) i aktivacije izvršnih kaspaza. Ovom se putu mogu suprotstaviti anti-apoptotici koji su članovi Bcl-2 porodice (npr. Bcl-2 i Bcl-X_L), najvjerojatnije heterodimerizacijom s pro-apoptotičkim članovima. 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 to ekvivalentno je da postoji nekoliko primjera virusne inhibicije puta apoptoze ovisnog o mitohondriju.



Slika 5. Elementi se okupljaju radi formiranja apoptosoma (preuzeto s:

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

Više onkogenih γ -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 antiapoptotički 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 člana 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 sprječava 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 Markotić, 2007. Virusi i apoptoza. *Infektološki 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 α / associates with Bax and inhibits TNF α
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/ TNFR2-like proteins, inhibition of TNF signal

3. 2. Signalni medijatori (TNF i Fas)

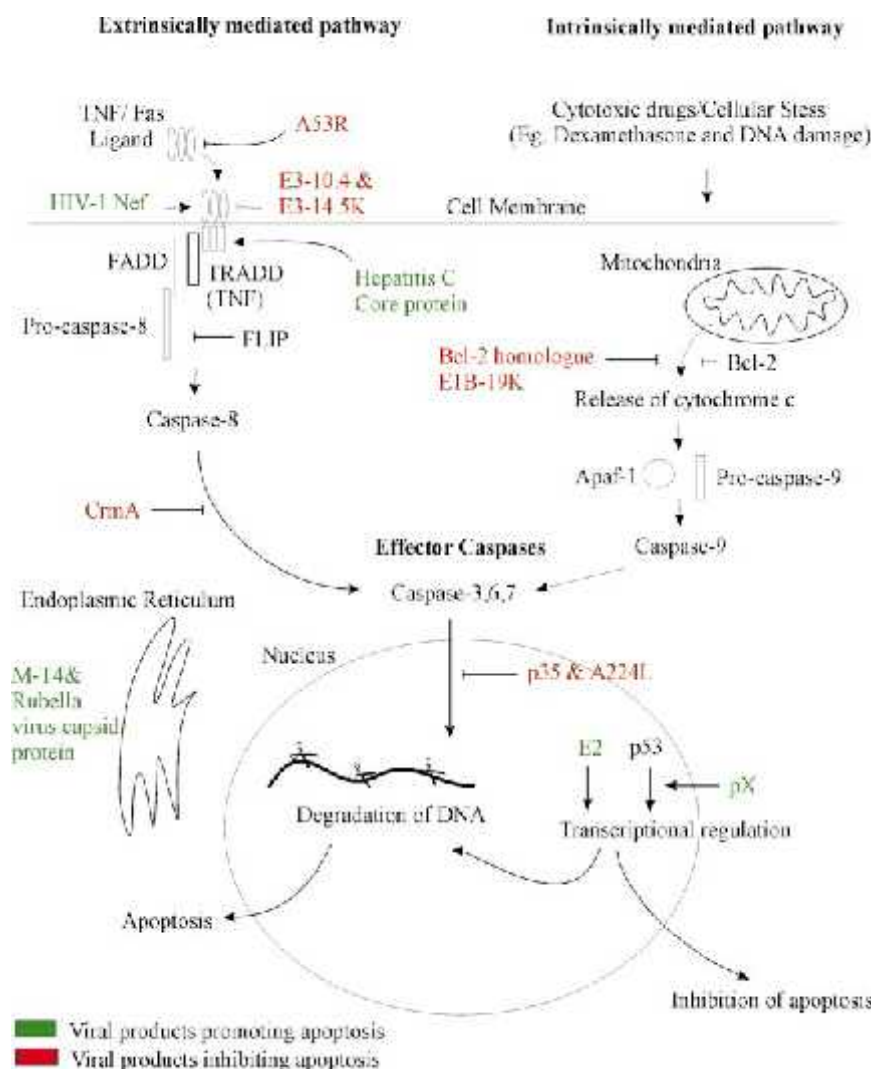
Bioraspoloživost liganada za receptore iz TNF porodice može se regulirati proizvodnjom topivih receptora mamaca koji nastaju cijepanjem i odvajanjem izvanstani nog dijela receptora od njegove unutarstani ne signalne domene ili pak proteinima sa sposobnoš u vezanja na isto vezno mjesto. Mnogi virusi iz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

Adenovirusi pak koriste drugu strategiju – smanjuju prisutnost samih receptora za FasL i TRAIL na površini inficirane stanice (Tab.1.). Oni specifično imaju direktni utjecaj u ranoj fazi, s proteinima E3-10.4K i E3-14.5K koji smanjuju prezentaciju molekula Fas na stani noj površini (Sl.6.). Ova redukcija apoptotičkih 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 djelovanja 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 različita proteina za koje je utvrđeno 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 natječe s TRADD vežu i se izravno na citoplazmatski rep TNFR1 i na taj način 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 transgenim miševima. Prema ovome, regrutacija citoplazmatskih adapterskih proteina, kako bi se modulirala signalizacija putem receptora smrti, čini se uspješnom strategijom koju i koristi velika većina virusa.

Myxoma virusni (MYXV) protein M-T2 je virusni protein koji oponaša TNF receptor i potencijalni je inhibitor ekstracelularnog apoptotičkog puta posredovanog TNF-om. Otpušta se u obliku monomera ili dimera i veže TNF, tako zaustavljajući i prijenos signala TNF receptorom. Protein također ima i mogućnost intracelularne supresije stani ne smrti u CD4⁺T limfocitima. Ta je funkcija drukčija od one vezanja ekstracelularnog TNF-a i posredovana je

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



Slika 6. Interakcija viralnih proteina s apoptotičkim putem doma ina. 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 domaćina na virusnu infekciju uključuje indukciju apoptoze inficiranih stanica putem leukocita. Proteini interferoni (eng. *interferon* - *IFN*) sudjeluju u tom procesu. Interferoni svojim potencijalom signalizacije omogućuju modulaciju imunog odgovora i stanice proliferacije (Balachandran i sur., 2000). Zanimljiva je mogućnost interferencije ovih proteina u apoptotičkim putevima. IFN, prilikom obavljanja svoje uloge, dovodi do ekspresije bitnih stanica i gena, poput serinske protein kinaze ovisne o dvolančnoj RNA (PKR), senzibiliraju i tako stanice sustava za indukciju smrti. Bilo koja faza virusne infekcije je osjetljiva na njezin inhibični kapacitet. Proteini IFN pripremaju stanice za apoptozu putem FADD-a. Neki virusi mogu svojim inhibitorima apoptoze blokirati ove puteve i omogućiti preživljavanje stanice (Ezelle i sur., 2001).

3. 4. Supresori kaspaza

Virusi mogu inhibirati apoptozu i putem inhibicije kaspaza. Među njima se nalazi i antiapoptotički 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 stanici proteinu. Mnogi poxvirusi nose uputu za kodiranje serpina (inhibitora serinskih proteaza) koji mogu vezati za i spriječiti djelovanje stanica 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 stanica kultura, ovi proteini imaju sposobnost blokiranja širokog spektra procesa ovisnih o proteazama te se čini da imaju i višestruke funkcije u promicanju virusnog umnožavanja *in vivo*.

Drugi antiapoptotički bakulovirusni protein je IAP. Proteini sisavaca koji su mu srodni uključuju XIAP, c-IAP1, c-IAP2 i survivin. Gen virusa ASFV-a, A224L, proizvodi protein srodan 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 ekspimirira 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 induciranu 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 stanici preživljavanje okolišnog stresa i posljedice oksidacije (Shisler i sur., 1998).

3. 7. Protein kinaze

U_S3, virusni gen koji kodira antiapoptotiki protein, produkt je virusa *Herpes simplex* (HSV) koji funkcionira kao serinska kinaza da bi se blokirala apoptoza inducirana virusima. U_S3 sura uje s U_S5 u supresiji apoptoze inducirane Fas receptorom ili UV zra enjem. U_S5 se ini bitnijim za inhibiciju apoptoze posredovane Fas-om od U_S3 (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. ZAKLJU AK

Virusi su, kao intracelularni paraziti, ovisni o živoj stanici. Kako bi si osigurali uspješno umnožavanje i prijenos na novog domaćina, razvili su različite 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 način 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 apoptotičkih tjelešaca, minimalizira se imunološki odgovor domaćina.

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. Virusi i apoptoza. *Infektološki 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 cytomegalovirus encoded 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- κ B activation, and TNF 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 MLIAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: Implications for Smad dependent 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 apoptotih puteva doma ina. Suprotno je o ekivanom da tako jednostavni 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 apoptotih 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.