

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Úloha proteinů rodiny Bcl-2 v organismu

Bakalářská práce

Autor práce: Markéta Končická

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Tereza Krejčová, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Úloha proteinů rodiny Bcl-2 v organismu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2013

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce Ing. Mgr. Tereze Krejčové, Ph.D. , své rodině a mému příteli za jejich podporu a pomoc při vypracování této práce.

Úloha proteinů rodiny Bcl-2 v organismu

The role of Bcl-2 proteins in organism

Souhrn

Apoptóza představuje typ programované buněčné smrti, jehož korektní regulace je naprosto nezbytná pro udržení fyziologických podmínek během vývoje i celého života jedince. Již během embryonálního vývoje totiž dochází ke vzniku velkého množství nadbytečných buněk, jež je bezprostředně nutné odstranit. Za to je právě zodpovědná apoptóza. Během embryonálního vývoje se prostřednictvím apoptózy například oddělují od sebe jednotlivé prsty, kontroluje se počet buněk, odstraňují se abnormality, tvoří se míšňový kanál v obratlicích a vytváří se jednotlivé tělní dutiny. I po celý život jedince apoptóza odstraňuje nemocné, staré, poškozené buňky a tím udržuje vnitřní homeostázu. Apoptóza je velice složitý proces a na její regulaci se podílí mnoho signálních kaskád a regulačních mechanismů. Apoptóza má dvě hlavní dráhy aktivace, a to vnější a vnitřní. Vnější dráha je aktivována navázáním ligandu na receptor na povrchu buňky. Vnitřní dráha je aktivována přes uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Obě apoptotické dráhy regulují proteiny rodiny Bcl-2.

Cílem této bakalářské práce je detailně popsat úlohu proteinů rodiny Bcl-2 při řízení průběhu apoptózy v organismu.

Rodina Bcl-2 proteinů zahrnuje velké množství evolučně konzervativních proteinů, které se různými mechanismy zapojují do regulace procesu apoptózy. Bcl-2 proteiny lze rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou antiapoptotické Bcl-2 proteiny, které brání aktivaci apoptózy a degradaci buňky. Druhou skupinou těchto proteinů jsou proapoptotické Bcl-2 proteiny. Proapoptotické Bcl-2 proteiny se podílejí na indukci apoptózy a spouštějí proces zániku buňky. Třetí skupinou jsou speciální proapoptotické proteiny označované jako BH3-only proteiny. Tyto specifické proteiny jsou schopné inhibovat antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny a dále jsou schopné aktivovat proapoptotické proteiny této rodiny. Vzájemný poměr Bcl-2 proteinů z jednotlivých skupin potom rozhoduje o tom, zda buňka podlehne apoptóze či nikoliv. Právě nerovnováha mezi těmito proteiny vede k velmi vážným onemocněním a patologiím, a proto je studiu úlohy Bcl-2 proteinů v organismu obecně věnována velká pozornost.

Klíčová slova: apoptóza, Bcl-2, BH3- only, mitochondrie, organismus

Summary

Apoptosis introduces a type of programmed cell death, whose proper regulation is essential for maintaining physiological conditions during the development of individual even of the whole life of the individual. During the embryogenesis is producing large amount superfluous cells that it is necessary to remove. That is what apoptosis do. Apoptosis during the embryogenesis for example separates individual fingers, controls numbers of cells, removes abnormalities, forms the spinal canal in the vertebrae and creates various body cavities. Throughout life of individual apoptosis removes diseased, old and damaged cells thereby maintains homeostasis. Apoptosis is a very complex process and on its regulation is involved many signalling cascades and regulatory mechanisms. Apoptosis has two main Pathways: Intrinsic and Extrinsic. Extrinsic pathway is activated after binding the ligand to the receptor on the cell surface. Intrinsic pathway is activated through the release of mitochondrial cytochrome c from mitochondria. Both apoptosis pathways regulate Bcl-2 family proteins.

The aim of this bachelor's thesis is to describe in detail the role of Bcl-2 family proteins during controlling of apoptosis in organism.

Bcl-2 family proteins includes a large amount of evolutionarily conservative proteins that are by different mechanisms involved in the regulation of apoptosis. Bcl-2 proteins are divided into three groups. The first group are antiapoptotic Bcl-2 proteins, which prevent the activations of apoptosis and cell degradation. The second group are proapoptotic Bcl-2 proteins. Proapoptotic Bcl-2 proteins are involved in the induction of apoptosis and initiate the cell death process. The third group are special proteins known as proapoptotic BH3-only proteins. These specific proteins are able to inhibit the antiapoptotic Bcl-2 family proteins and are able to activate the proapoptotic proteins of this family. The ratio of Bcl-2 proteins from each group then decides on whether to succumb to cell apoptosis or not. The imbalance between these proteins leads to very serious diseases and pathologies and therefore is the study role of Bcl-2 proteins in the body in general attention.

Keywords: apoptosis, Bcl-2, BH3- only, mitochondria, organism

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Apoptóza	3
3.1.1 Vnější dráha apoptózy	5
3.1.2 Vnitřní dráha apoptózy	6
3.1.3 Mitochondrie.....	7
3.1.3.1 Cytochrom c	8
3.1.4 Kaspázy.....	9
3.1.5 Inhibitory apoptózy.....	11
3.1.5.1 Smac/DIABLO	13
3.1.5.2 Htr A2/Omi.....	13
3.1.6 Proteiny rodiny Bcl-2.....	14
3.1.6.1 Antiapoptotické Bcl-2 proteiny	16
3.1.6.2 Proapoptotické multidoménné Bcl-2 proteiny.....	25
3.1.6.3 Proapoptotické BH3-only proteiny.....	27
4 Závěr.....	31
5 Seznam použité literatury.....	32

1 Úvod

Apoptóza je důležitá v regulaci vývoje jedince během embryogeneze, ale i v postnatálním vývoji. Je závislá na energii ATP a neprobíhá při teplotě nižší než 4 °C. Apoptóza je geneticky kódována a nezbytná pro přežití organismu. Původně byla považována za protiklad nekrózy, protože jsou morfologicky velmi odlišné. Apoptotická buňka se zmenšuje, vytvoří apoptotická tělíska a následně je odstraněna okolními buňkami a makrofágy. Zatímco nekrotická buňka se zvětšuje a bobtná v důsledku porušení funkce cytoplazmatické membrány. U nekrotické buňky pak dochází k jejímu prasknutí a vyjití buněčného obsahu do mezibuněčného prostoru, což vyvolá zánětlivou reakci a poškození okolních buněk. Po nekróze na tkáních zůstávají viditelné morfologické změny, zatímco po apoptoticky odstraněných buňkách změny na tkáních většinou nejsou patrné. To je spojeno i s tím, že apoptóza odstraňuje jen jednotlivé a roztroušené buňky, naproti tomu nekróza často postihuje větší plochy tkání. K nekróze buněk dochází v případě, že na apoptózu nemá buňka čas nebo dostatek energie a nebo při velkém poškození buňky a hlavně její membrány.

Apoptóza je pozorována a rozeznávána už více jak 150 let. Ovšem její název poprvé použil Kerr až v roce 1972. „Apoptosis“ latinsky znamená padání listů. Apoptóza se v organismu účastní neurogeneze, regenerace tkání, náhrady buněk, odstranění poškozených buněk, v imunitní odpovědi a regulaci buněk imunitního systému, a také udržuje správnou velikost a funkci tkání a orgánů.

Apoptóza je aktivována vnější a vnitřní dráhou, v obou těchto drahách se uplatňují proteázy z rodiny kaspáz a proteiny rodiny Bcl-2. Bcl-2 proteiny jsou proapoptotické i antiapoptotické a tím tvoří dvojí kontrolu apoptózy. Což zabraňuje indukci apoptózy v případě, že signál indukující apoptózu není dost silný. Naopak u poškozených nemocných buněk a buněk napadených virem je signál dostatečný a antiapoptotické Bcl-2 proteiny nejsou schopny jí zabránit. Pokud apoptóza dojde do exekuční fáze, kdy jsou aktivovány ve velké míře kaspázy, nukleázy a další proteázy, nedá se apoptóze už zabránit, protože došlo k roštěpení genetické informace. Apoptotická buňka je pak následně odstraněna fagocytózou.

Takto apoptóza funguje za normálních podmínek, pokud není signál apoptózy nijak poškozen. Ale v případě, že jsou v buňce deletovány antiapoptotické proteiny nebo je naopak overexprese proapoptotických proteinů, dochází k přílišné apoptóze a tedy ztrátě zdravých buněk, které měly přežít. Zatímco při delecii proapoptotických a nebo nadbytku antiapoptotických proteinů dochází k nashromáždění velkého množství nemocných a poškozených buněk, což může způsobit vznik nádorů a rakovin.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je shrnutí funkce a uplatnění proteinů rodiny Bcl-2, které se podílí na regulaci apoptózy, poté specifikace jejich působení v biologických procesech živých organismů. Práce se dále bude zabývat poškozením organismů při delecí nebo overexpresi proapoptotických a antiapoptotických Bcl-2 proteinů a jejich rolí při regulaci poškozených buněk mechanismy programované buněčné smrti.

3 Literární rešerše

3.1 Apoptóza

Buněčná smrt se dělí na programovanou buněčnou smrt a náhodnou buněčnou smrt. Programovaná buněčná smrt se dále dělí na několik morfoloicky i enzymaticky odlišných typů. Těmito typy jsou: apoptóza, programovaná nekróza, autofagie, paraptóza a mitotická katastrofa. Zatímco nekróza je náhodná buněčná smrt způsobená různým poškozením buňky. Poškození buňky způsobující nekrózu může být například tepelné, chemické a mechanické (Kerr et al., 1972).

Podle morfoloických odlišností od nekrózy je apoptóza známa už více jak 150 let. Ovšem název apoptóza poprvé použil profesor patologie John Foxton Ross Kerr z Queenslandské University se svými spolupracovníky až v roce 1972 pro speciální formu buněčné smrti (Shiozaki et Shi, 2004). Apoptóza byla původně považována za protiklad nekrózy kvůli jejich velké morfoloické odlišnosti (Balaž et al., 2008). Nejvýznamnějším rozdílem mezi apoptózou a nekrózou je jejich závislost na energii. Apoptóza je závislá na energii buňky a vede k fagocytóze (Ziegler et Groscurth, 2004). Nekrotická buňka bobtná, až dojde k jejímu prasknutí a vytlí obsahu do okolí buňky (Balaž et al., 2008). To způsobí zánětlivou reakci organismu (Jacobson et al., 1997). Bobtnání buňky je způsobeno nedostatkem energie, který se projeví poškozením funkce iontových pump na cytoplazmatické membráně. Zatímco u apoptózy je funkce cytoplazmatické membrány zachována, buňka se smrskává a tvoří se apoptotická tělíska (Balaž et al., 2008). Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je nutná pro odstranění napadených a poškozených buněk (Willis et al., 2003). Apoptóza ovlivňuje pouze rozptýlené a jednotlivé buňky, ale prakticky nikdy neodstraňuje větší plochy tkání (Kerr et al., 1972). Účastní se redukce buněk během embryonálního vývoje (Ziegler et Groscurth, 2004). U savců v embryonálním vývoji vytváří míšní kanál v obratlích, tělní dutiny, tvoří trubice, odstraňuje přebytečné neurony a separuje jednotlivé prsty. Apoptóza v embryonálním vývoji u samců odstraňuje zárodky samičích pohlavních orgánů (Müllerovy vývody) a u samic jsou zase odstraněny zárodky samčích pohlavních orgánů. V embryogenezi se vytváří nadbytečné množství neuronů, a ty, které nejsou propojeny s tkání nebo nefungují správně, jsou odstraněny (Jacobson et al., 1997). Apoptóza je nezbytným mechanismem morfogeneze a homeostázy orgánů i tkání, protože udržuje rovnováhu mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí. Například při klonální selekci jsou lymfocyty eliminovány apoptózou. Apoptóza dále kontroluje expanzi a dozrávání T a B lymfocytů

v periferních lymfatických orgánech po tom, co rozpoznaly antigen (Pedrera et al., 2012). V apoptóze jsou důležité protein-proteinové interakce mezi proteiny proapoptotickými a antiapoptotickými. Rovnováha mezi těmito proteiny je velmi důležitá pro život jednotlivých buněk a fungování celého organismu (Rautureau et al., 2010).

Jakékoliv defekty v normálním fungování apoptózy mohou způsobit onemocnění. Pokud je apoptóza příliš inhibována vznikají nádorová onemocnění, protože přežívají buňky s poškozenou DNA. Nadměrná apoptóza naopak může způsobovat poškození při onemocněních jako je mrtvice, infarkt, cirhóza jater, AIDS, také u neurodegenerativních onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova nemoc a u septického šoku. Neurodegenerativní onemocnění jsou charakteristická předčasnou ztrátou specifických neuronů. To způsobuje nevratnou ztrátu paměti a nebo neschopnost ovládat pohyby svalů. Při inhibici apoptózy mohou vznikat trvalé infekce způsobené tím, že buňky napadené viry a bakteriemi přežily (Rvagnan et al., 2002; Willis et al., 2003; Zhai et al., 2003; Petros et al., 2004). Přerušeni apoptotického procesu také může vést k autoimunitnímu lymfoproliferačnímu syndromu (ALPS) (Petros et al., 2004). Defekt v mechanismu apoptózy také hraje významnou roli v rezistenci na chemoterapii a ozařování (Tamm et al., 1998).

Kerr et al. (1972) uvádí, že apoptóza probíhá ve dvou stádiích. V prvním stadiu se formují apoptotická tělíška a ve druhém stadiu probíhá fagocytóza a degradace těchto tělíšek (Kerr et al., 1972). Buňky podléhající apoptóze vykazují zřetelné morfologické a molekulární znaky. Morfologickými znaky jsou membránový blebbing, nukleární a cytoplazmatická kondenzace. Zatímco molekulárními znaky jsou: degradace chromozómů, nukleosomální fragmentace a následná aktivace proteáz z rodiny kaspáz (Shiozaki et Shi, 2004). Apoptózu indukuje poškození integrity DNA, deprivace růstového faktoru, činnost cytotoxických T lymfocytů, virové infekce, mnoho stresových faktorů, radiace nebo narušení homeostázy buněk. (Ziegler et Groscurth, 2004; Pedrera et al., 2012).

Všechny tyto stimuly mohou způsobit navázání ligandu na receptory rodiny TNF (tumor necrosis factor), které jsou na povrchu buňky. To spustí vnější signální dráhu buněčné smrti. Krátce po indukci apoptózy buňka ztrácí kontakt s okolními buňkami. Smršťující se buňka tvoří bleby, které obsahují buněčné organely a fragmenty buněčného jádra. Bleby jsou následně fagocytovány okolními buňkami nebo makrofágy (Jacobson et al., 1997; Ziegler et Groscurth, 2004). K fagocytóze dochází předtím, než membrána začne propouštět buněčné tekutiny, čímž je zamezeno vzniku zánětu (Jacobson et al., 1997). Pokud nejsou

buněčné zbytky fagocytovány, vzniká sekundární nekróza, která obdobně jako nekróza poškozuje své okolí a vyvolává zánět (Ziegler et Groscurth, 2004; Balaž et al., 2008).

3.1.1 Vnější dráha apoptózy

Vnější dráha apoptózy je závislá na funkci receptorů na povrchu buňky, které jsou označovány jako receptory smrti. Receptory jsou bílkoviny schopné navázat molekulu zvanou ligand. Receptory jsou umístěny na povrchu cytoplazmatické membrány a přenášejí do buňky signály z vnějšího prostředí. Tyto receptory po navázání ligandu předají signál do buňky. Tento signál způsobí aktivaci intracelulární dráhy a následně buněčnou smrt (Balaž et al., 2008). Většina receptorů smrti spolupracuje s intracelulární doménou zvanou „Death doména“, ta přenáší signál do buňky (Thorburn, 2004). Hlavními receptory této dráhy jsou receptory rodiny TNF (tumor necrosis factor), Fas (CD95/APO-1), TNFR1 a TRAIL receptory (DR4 a DR5) (Thorburn, 2004; Ziegler et Groscurth, 2004; Danial, 2007).

Na membránové receptory se váží ligandy jako je FasL nebo TNF α . Každý receptor má svůj specifický ligand, který je schopen se na něj vázat. Typické dvojice ligand-receptor jsou například FasL-FasR a TNF α -TNFR1. Schopnost receptorů indukovat apoptózu je důležitá pro zamezení vzniku mnoha onemocnění (Shiozaki et Shi, 2004; Thorburn, 2004; Simmons et al., 2008).

Chemická struktura receptorů se po navázání ligandu mění. Death receptory, na které nejsou navázány ligandy, jsou monomerické, zatímco ligandy jsou homotrimerické (Shiozaki et Shi, 2004). Po navázání ligandu na receptor smrti se pravděpodobně vytvoří neasociovaný trimer (Thorburn, 2004). Ligand navázaný na receptor spolu s adaptorovými proteiny a prokaspázou-8 nebo u lidí prokaspázou-10 formují komplex receptorů DISC (Death Inducing Signalling Complex). Adaptorové proteiny jsou typické pro různé receptory, FADD asociuje s Fas a TRADD s TNFR1. (Thorburn, 2004). Prokaspáza-8 a -10 jsou schopné se po kontaktu s komplexem DISC autokatalyticky aktivovat (Shiozaki et Shi, 2004; Thorburn, 2004; Ziegler et Groscurth, 2004; Adams et al., 2007; Pedrera et al., 2012). Aktivovaná kaspáza-8 aktivuje efektorové kaspázy -3 a -7. Signál vnější dráhy přechází na vnitřní dráhu přes štěpení Bid proteinu na tBid, který způsobí uvolnění cytochromu c z mitochondrií a aktivaci kaspázy-9. Tím je spuštěna kaspázová kaskáda (Kar et al., 2012) a tBid pak dále indukuje konformační aktivaci a oligomerizaci proteinů Bak a Bax (Simmons et al., 2008). Pokud je buňka vystavena dlouhému působením nanočástic mědi, výrazně se v buňce zvyšují hladiny Fas, kaspázy-8 a tBid proteinu (Sarkar et al., 2011).

Apoptotický signál může být inhibován prostřednictvím působení kompetitivních molekul jako například inhibitoru c-FLIP, který se váže na receptorový komplex DISC v místě kaspázy-8 (Thorburn, 2004). U lidských buněk nádoru prsu MCF7 je apoptóza indukovaná Icaricidem II (IcaS) přes dvě odlišné receptorové dráhy. Icarisid II je glykosid, který se používá při léčbě nádoru prsu. Jedna dráha indukovaná IcaS jde přes receptor FADD, jehož C-terminální doména interaguje s Fas a N-terminální doména interaguje s kaspázami. Druhá dráha jde přes protein Daxx, který se naváže na FAS a indukuje apoptózu přes JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinase) dráhu (Huang et al., 2012)

3.1.2 Vnitřní dráha apoptózy

Vnitřní dráha apoptózy je aktivována přes mitochondrie a je tedy na mitochondriích závislá (Shiozaki et Shi, 2004). Vnitřní dráha apoptózy je spuštěna reakcí uvnitř buňky na signál jako je stresový signál, poškození DNA, cytokinová deprivace, hypoxie nebo ztráta signálu přežití (survival signal) (Stoka et al., 2006; Adams et al., 2007). Vnitřní dráhu apoptózy může vyvolat i intoxikace nanočásticemi mědi, která způsobí uvolnění cytochromu c a Apaf-1 a aktivaci kaspázy-9 (Sarkar et al., 2011). Také může navazovat na vnější dráhu apoptózy při aktivaci Bid proteinu, který poškodí mitochondrie, čímž dojde k uvolnění cytochromu c, který následně aktivuje kaspázovou kaskádu (Kar et al., 2012). Po apoptotickém stimulu jsou do cytoplasmy uvolněny proteiny z mitochondriálního intermembránového prostoru. V intermembránovém prostoru mitochondrií jsou proteiny: cytochrom c, Smac (second mitochondria derived activator), známý také jako DIABLO, AIF (apoptosis-inducing factor), Endonukleasa G a Omi/HtrA2 (Shiozaki et Shi, 2004).

Vnitřní dráha může být také indukovaná oxidativním stresem, což způsobí poškození mitochondrií, tím se uvolní cytochrom c a následně se aktivuje kaspáza-3 (Sarkar et al., 2011). Po porušení mitochondrií se s cytochromem c do cytosolu uvolní i adenosin-5'-trifosfát (ATP) (Slee et al., 1999; Pedrera et al., 2012). Cytochrom c spolu s Apaf-1, který je připraven v cytoplasmě, vytvoří apoptozóm, který dále aktivuje kaspázu-9 (Ziegler et Groscurth, 2004). Vytvoření apoptozómu a připojení aktivní (nebo aktivace) Kaspázy-9 pak pokračuje v aktivaci efektorových kaspáz, kaspázy-3 a -7. Štěpení různého intracelulárního substrátu efektorovými kaspázami a dalšími proteázami nakonec vyústí v buněčnou smrt a mrtvá buňka je pohlcena makrofágy (Shiozaki et Shi, 2004; Thorburn, 2004).

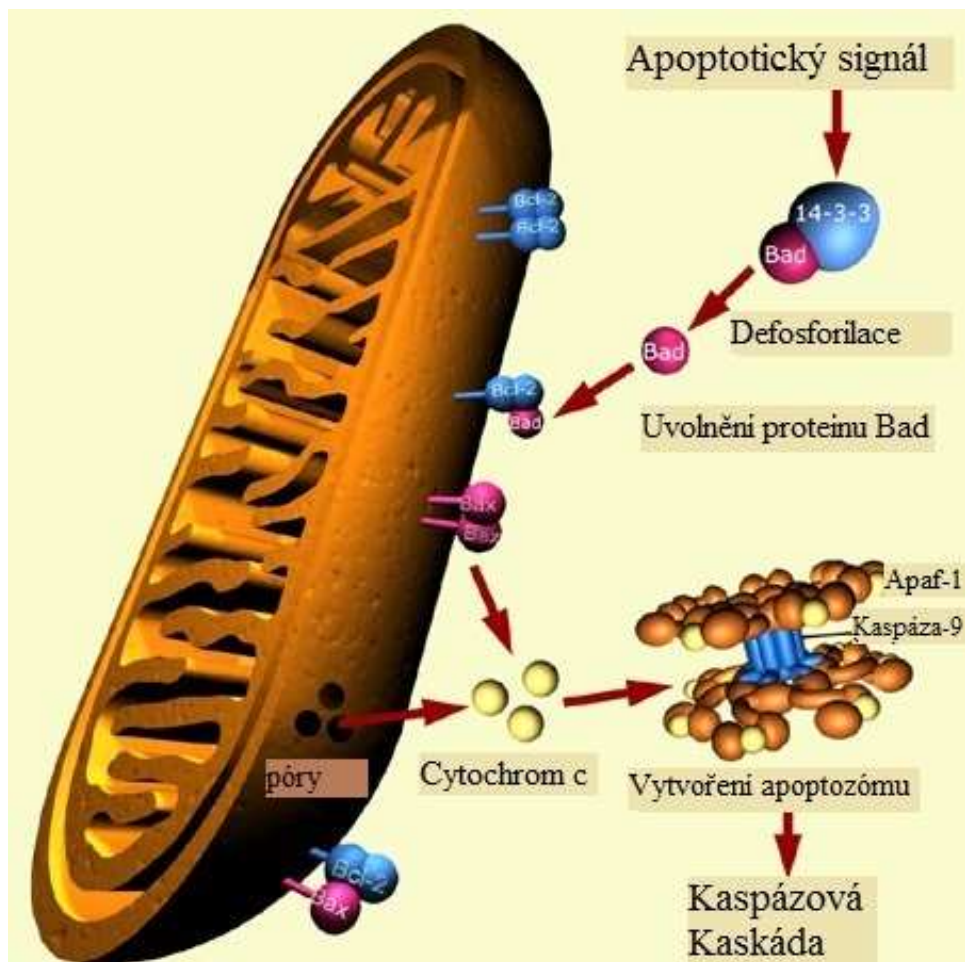
K uvolnění cytochromu c jsou potřeba BH3-only Bcl-2 proteiny, které inhibují antiapoptotické Bcl-2 proteiny. BH3-only proteiny se navažou na antiapoptotické proteiny a tím s nimi vytvoří neaktivní dimery (Thorburn, 2004). U buňky s dvojitou delecí, jak Bax, tak Bak proteinu, selže uvolnění cytochromu c a buňka je rezistentní vůči všem stimulům vnitřní dráhy apoptózy. Multidoménové proapoptotické proteiny Bak a Bax jsou tedy nutné k aktivaci mitochondriální apoptotické mašinerie (Danial, 2007). U savců nemají antiapoptotické Bcl-2 proteiny schopnost se přímo vázat na Apaf-1, tak jako je tomu *Caenorhabditis elegant* (Maupas, 1899). Dráha přes cytochrom c/Apaf-1/kaspázu-9 nejspíš není jediným způsobem, jak dokáží Bcl-2 proteiny inhibovat vnitřní dráhu smrti u mnoha buněk. Protože nejsou schopny inhibovat Apaf-1 přímo, musí proteiny Bcl-2 ovládat fázi před uvolněním cytochromu c (Willis et al., 2003). Buňka se stává rezistentní vůči apoptóze pokud nastane overexprese antiapoptotických Bcl-2 proteinů, protože nedojde k uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Pedrera et al., 2012). Stoka et al., (2006) zjistil, že rozdíly v aktivaci vnitřní dráhy jsou u laboratorních myší dány jednotlivými kmeny, ale ne stářím zvířat nebo typem tkáně. (Stoka et al., 2006)

3.1.3 Mitochondrie

Mitochondrie jsou centrem apoptózy v savčích buňkách, kde se setkává vnější a vnitřní dráha apoptózy. Mitochondrie mají vnitřní a vnější membránu. Vnější membrána je hladká a obaluje mezimembránový prostor mitochondrií, zatímco vnitřní membrána má povrch zvrásněný a tvoří krysty. Ve středu mitochondrií je mitochondriální matrix, která je od mezimembránového prostoru oddělena vnitřní membránou (Zhai et al., 2008). Apoptóza probíhá většinou přes uvolnění proapoptotických proteinů z mezimembránového prostoru mitochondrií. V tomto prostoru se vyskytují proteiny cytochrom c, Smac/DIABLO, AIF, Endonukleasa G a Htra2/Omi. Cytochrom c, Smac/DIABLO a Htra2/Omi mohou způsobit uvolnění prokaspáz a jejich následnou aktivaci. AIF a endonukleasa G způsobují smrt nezávislou na kaspázách (Kuwana et al., 2003). Stabilita vnitřní membrány mitochondrií je udržována membránovým potenciálem. Stálý membránový potenciál udržuje aktivita protonových pump respiračního řetězce. Po indukci apoptózy začne membránový potenciál prudce kolísat, ale permeabilizace membrány je zatím jen částečná, protože matrixové proteiny ještě nejsou uvolněny do cytosolu buňky (Ravagnan et al., 2002). Na vnější mitochondriální membránu (MOM) je zaměřeno velké množství proteinů, například Bcl-xL, M11L protein myxoma viru a hNIP3 (Schinzel et al., 2004). Po kompletní permeabilizaci

vnější membrány mitochondrií pronikají potenciálně toxické mezimembránové proteiny do cytosolu a způsobí degenerativní fázi apoptózy (Ravagnan et al., 2002)

Obrazek č. 1. Schéma mitochondrií a průběhu apoptózy od apoptotického signálu po aktivaci kaspázové.



Převzato a upraveno z <http://www.herbalzym.com/2010/09/induction-of-apoptosis-by-natural-agents-through-mitochondrial-cell-death-pathway-part-1/>

3.1.3.1 Cytochrom c

Cytochrom c je protein, který za normálních podmínek funguje v dýchacím řetězci jako přenašeč elektronů (Danial, 2007; Balaž et al., 2008). Prekurzorem cytochromu c je apo-cytochrom-c, který je neschopný se účastnit apoptózy. Prekurzor je následně importován do mitochondrií, kde je přetvořen do globulárního proteinu (Ravagnan et al., 2002). Cytochrom c je proapoptotický protein, který se váže a aktivuje Apaf-1. Vazba cytochromu c

indukuje konformační změny na Apaf-1 proteinu. Tyto konformační změny umožňují vytvořit vazbu na dATP vedoucí k formování ~1MDa oligomerního komplexu pojmenovaného apoptozom (Shiozaki et Shi, 2004). Cytochrom c je uvolněn po narušení mitochondriálního membránového potenciálu do cytosolu. Tam se pak váže na Apaf-1 a tvoří komplex s caspazou -9, která se stává aktivní a aktivuje kaspázovou kaskádu. Tím se aktivují další kaspázy (například kaspáza-3) a výsledkem této aktivace je buněčná smrt (Cook et al., 1999). Bcl-2 protein je schopen zabránit permeabilizaci vnější membrány mitochondrií, čímž zabrání uvolnění cytochromu c (Stoka et al., 2006). Apoptóza vyvolaná p20Bap31 vede přes mobilizaci zásob vápníku v ER. Uvolněním Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER) se následně zvedá hladina Ca^{2+} v mitochondriích. Toto tvoří senzitivující signál (“sensitizing signal”) pro uvolnění proapoptického faktoru cytochromu c, který umožňuje efektivní permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, což vede k aktivaci kaspáz a následnému štěpení organel (Heath-Engel et al., 2012).

3.1.4 Kaspázy

Kaspázy jsou proteolytické enzymy z rodiny cysteinových proteáz. Jako první byla objevena kaspáza-1, respektive její homolog u hád'átka *C. elegans*. Velká část těchto proteáz je důležitá v procesu apoptózy. U savců bylo identifikováno nejméně 14 kaspáz, ale jen část z nich se účastní apoptózy. Kaspázy, které se neúčastní apoptózy jsou součástí zánětlivé odpovědi organismu (Pedrera et al., 2012). Neaktivní formou kaspázy je prokaspáza nebo zymogen a je tvořen jedním řetězcem (Ravagnan et al., 2002; Shiozaki et Shi, 2004). Prokaspázy jsou obsaženy nejčastěji v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií včetně prokaspáz-2, -3 a -9. (Ravagnan et al., 2002). Katalytické jádro proteáz se skládá ze dvou podjednotek p20 a p10, které tvoří N-terminální prodoménu kaspáz. Při intramolekulárním štěpení prokaspáz jsou od sebe tyto dvě podjednotky odděleny, čímž je kaspáza aktivována (Shiozaki et Shi, 2004). Prokaspáza-9 nemá pravděpodobně žádnou enzymatickou aktivitu, pokud v cytosolu není přítomen Apaf-1. U savců jsou mechanismy buněčné smrti, které fungují i bez kaspáz, ale apoptóza je bez nich velmi omezená. Inhibice kaspáz významně zpomaluje formování apoptotických tělísek. U mnoha typů indukce apoptózy nejsou farmakologické inhibitory kaspáz schopny předejít aktivaci buněčné smrti, protože apoptóza funguje i s inhibovanými kaspázami (Rvagnan et al., 2002).

ICE (interleukin-1 β -converting enzyme) kaspázy jsou zapojeny hlavně do zánětlivé odpovědi. Mezi ICE kaspázy u lidí patří kaspáza-1, -4 a -5 a u myši kaspáza-1, -11 a 12 (Slee et al., 1999; Shiozaki et Shi, 2004). Tyto kaspázy nejsou aktivovány cytochromem c což ukazuje, že se neúčastní apoptózy (Slee et al., 1999). Kaspázy-1 a -11 jsou zapojeny do zpracování prozánětlivých cytokinů jako jsou interleukin 1 a interleukin 18 (Danial, 2007). Cytochrom c štěpí kaspázu-1 jen v určitých koncentracích (Slee et al., 1999).

Iniciační kaspázy (apikální), zahrnují kaspázu-2, -8, -9 a -10 a mají dlouhé prodomény. Tyto prodomény obsahují homotypický interakční motiv (Shiozaki et Shi, 2004). Iniciační kaspázy mohou být aktivovány vnější dráhou komplexem DISC a nebo vnitřní dráhou přes mitochondrie v interakci s apoptozómem. Aktivované iniciační kaspázy dále štěpí a aktivují efektorové kaspázy (kaspáza-3, -6, -7). Efektorové kaspázy pak zprostředkovávají štěpení mnoha důležitých buněčných proteinů (Adams et al., 2007; Danial, 2007). Kaspáza-9 je aktivována při vazbě na speciální molekulární podklady (molecular Platform), které jsou tvořeny přes selektivní proteino-proteinové interakce (Danial, 2007). Prodoména kaspázy-9 obsahuje CARD (caspase-recruitment domain), která spolupracuje s CARD doménou v Apaf-1. Interakce mezi dvěma CARD doménami, váže kaspázu-9 do apoptozómu (Shiozaki et Shi, 2004). Molekulární podklad u iniciačních kaspáz tvoří „death domain“, „death effector domain“ a „caspase recruitment domain“ (Danial, 2007). V in vitro studiích bylo zjištěno, že kaspáza -9 se selektivně váže na Apaf-1, zatímco ostatní kaspázy (-1, -2, -3, -6, -7, -8 a -10) se na Apaf-1 neváží. Pokud je z buněčného extraktu odstraněna Kaspaza-9, nedojde k aktivaci kaspáz-2, -3, -7, -8, -10 cytochromem c, což ukazuje, že kaspáza-9 je nezbytná pro všechny následné aktivace kaspáz (Slee et al., 1999).

Induced-proximity je model, který říká, že iniciační kaspázy jsou aktivovány, pokud přijdou do kontaktu s jinými iniciačními kaspázami. Tedy, že jsou schopny se samy navzájem aktivovat. Podle Daniala induced-proximity model znamená, že aktivace iniciačních kaspáz je ovlivněna jejich lokální koncentrací a je zvýšena při vytvoření DISC nebo apoptosomu (Danial, 2007).

Proximity-induced model naznačuje, že kaspáza-9 a kaspáza-8 jsou aktivovány po dimerizaci usnadněné oligomerními komplexy, jako je apoptozóm nebo DISC (Shi, 2004; Shiozaki et Shi, 2004).

Mezi **efektorové kaspázy** patří kaspáza 3, 6 a 7 (Pedrera et al., 2012). Aktivace zymogenu efektorových kaspáz zahrnuje specifické intra-řetězcové štěpení. Toto štěpení

zprostředkovávají iniciační kaspázy. V důsledku tohoto štěpení je aktivita efektorových kaspáz několikanásobně zvýšena (Shiozaki et Shi, 2004). Efektorové kaspázy jak aktivované, tak zymogeny jsou tvořeny homodimerem (Shi, 2004).

Aktivní místo každých kaspázových molekul se skládá ze tří smyček, označených L1, L3 a L4. Na tyto smyčky je schopen se vázat substrát. Smyčka L1 a L4 tvoří dvě strany žlábků, který váže substrát a L3 smyčka tvoří základnu tohoto žlábků. Čtvrtá smyčka L2, která obsahuje katalytický cystein, leží napříč vázajícím žlábkem v přední části substrátu. Tuto konformaci aktivního místa podporuje pátá smyčka L2', která přichází ze sousední kaspázové molekuly v homodimeru. Umístění smyčky L2' je esenciální pro formování aktivního místa, které přispívá ke katalýze. (Shi, 2004; Shiozaki et Shi, 2004). Kaspáza-3 narušuje buňku procházející apoptózou tím, že rozkládá stovky proteinů (Thorburn, 2004). Aktivace kaspázy-3 je nutná pro aktivaci 4 dalších kaspáz (-2, -6, -8, a-10). Účastní se také zpětné amplifikace zahrnující Kaspázu-9 (Slee et al., 1999). Aktivní kaspázu-3 a -7 blokuje protein survivin, ale inaktivní preformu blokovat nedokáže. Většina proteinů rodiny IAP včetně survivinu nejsou schopné vázat aktivovanou kaspázu-8 in vitro. Survivin tak inhibuje pouze apoptózu indukovanou overexpresí prokaspázy-3 a -7 (Tamm et al., 1998).

3.1.5 Inhibitory apoptózy

IAP byl objeven před 15 lety Millerem a jeho kolegy v genu Baculoviru jako inhibitor apoptózy. Tato virová infekce postihuje buňky hmyzu *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Srinivasula et Ashwell, 2008). Dnes je známo mnoho homologů IAP proteinů a byly nalezeny jak u bezobratlých (nematod, much) a kvasinek, tak u vyšších obratlovců (Bonney-Boyd et al., 2004; Stoka et al., 2006). Mezi inhibitory apoptózy patří IAP proteiny (IAP-1, IAP-2, NAIP, XIAP a survivin), antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny a několik zástupců ze skupiny chaperonů (Tamm et al., 1998; Stoka et al., 2006).

XIAP protein se skládá ze tří BIR domén a C-terminálního RING motivu. (Shiozaki et Shi, 2004). Motiv BIR2 má krátký doprovodný N-Terminální úsek s 18 aminokyselinami, kde je vazebné místo, které se silně váže na kaspázu-3 a -7. Na rozdíl od kaspázy-3 a -7 se kaspáza-9 váže na BIR3 doménu proteinů IAP. Molekuly interagující s BIR doménou IAP proteinů jsou mitochondriální protein Smac (DIABLO) a Omi (HtrA2). Oba mají IAP-binding motif (IBM), na který se váže na BIR doménu proteinů IAP (Shiozaki et Shi, 2004; Srinivasula et Ashwell, 2008). Smac protein je schopen porušit vazbu IAP proteinu a aktivované kaspázy-9. Tím je kaspáza-9 uvolněna a znovu aktivována apoptóza (Klener et

Klener, 2010). NAIP (neuronal apoptosis-inhibitory protein) je protein, který inhibuje apoptózu neuronů u savců. NAIP protein váže kaspázu-9 pouze v přítomnosti ATP nebo při absenci leucine-rich repeat (LRR) domény, což ukazuje, že ATP zprostředkovává konformační změny, které jsou nutné pro vazbu kaspázy-9 (Srinivasula et Ashwell, 2008).

Proteiny IAP se u savců účastní regulace apoptózy i buněčného dělení (Bonney-Berard et al., 2004). Navíc jsou také zapojeny do mitotické chromozomální segregace, celulórní morfogeneze, homeostázy mědi a do intracelulární signalizace (Srinivasula et Ashwell, 2008). IAP proteiny jsou schopné inhibovat apoptózu u buněk infikovaných virem. Tímto způsobem si vir zajišťuje přežití. Inaktivace apoptózy proteiny IAP spočívá v tom, že se dokážou navázat na aktivované iniciační i efektorové kaspázy a tím je inaktivují (Klener et Klener, 2010). IAP protein netvoří stabilní komplexy s prokaspázou-9 protože nemá odkrytý N-terminalní konec. Proteolytické zpracování prokaspázy-9 odhaluje tento vnitřní tetrapeptidový motiv a IAP je schopen se na ni navázat (Shiozaki et Shi, 2004). Vysoká exprese IAP proteinů byla nalezena v mnoha nádorech jako je karcinom prsu, prostaty, pankreatu a u lymfoproliferace. Například u survivinu jeho upregulace způsobuje špatnou prognózu onemocnění (Klener et Klener, 2010). Mnoho virů má rozvinuté strategie, kterými brání a blokuje apoptózu. Některé viry rozvinuly strategii zaměřenou na aktivaci apoptózy, aby se vyhnuly imunitní odpovědi tím, že zničí imunokompetentní buňky (Pedrera et al., 2012).

U Huntingtonovy choroby byla zjištěna degradace proteinů IAP-1 a XIAP, která je spojena s nadměrnou apoptózou. IAP protein způsobuje rezistenci vůči apoptóze v hypoxických buňkách. Ve studii prováděné na potkaních bylo objeveno, že kalorická restrikce může poskytnout protekci neuronům a při stárnutí mozku částečně potlačuje aktivaci kaspázy-3 a štěpení PARP a další upregulaci XIAP inhibitoru. To se později podílí na zvýšení rezistence vůči apoptóze pozorované u zvířat s kalorickou restrikcí (Stoka et al., 2006). Dalším inhibitorem apoptózy je ZLEHD-fmk. Inhibitorem ZLEHD-fmk je inhibována apoptóza způsobená kaspázou-8 a kaspázou-9, které podněcují vnější i vnitřní apoptotickou kaskádu. Tyto inhibitory výrazně snižují aktivaci kaspázy-8 a -9 (asi o 60%) (Kar et al., 2012).

3.1.5.1 Smac/DIABLO

V buňkách, které podstupují apoptózu Smac (Second Mitochondrial activator of Caspases) nebo DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low pI) protein uvoňuje blokaci kaspáz proteiny rodiny IAP. Smac protein je cílen do mitochondrií přes N-terminální doménu. V odpovědi na mnoho apoptotických stimulů je Smac/DIABLO uvolněn do cytosolu, kde inhibuje proteiny IAP (Ravagnan et al., 2002). Smac je syntetizován jako 239 aminokyselinový prekurzor. Jeho N-terminální sekvence je zaměřena do mitochondrií a je u Smac proteinu proteolyticky odstraněna. Po proteolytickém štěpení a odstranění N-terminální sekvence se u proteinu Smac odhalí 4 hydrofobní aminokyseliny Ala-Val-Pro-Ile. Tento tetrapeptid je vazebným motivem pro rodinu proteinů IAP. Tím, že se Smac naváže na IAP protein není IAP schopen se vázat na kaspázy a inhibovat je. Smac protein je v buňkách účinný, ale jeho prekurzor ne. Během apoptózy je Smac protein uvolněn z mitochondrií a obnovuje proces aktivace iniciátorových a efektorových kaspáz tím, že uvolňuje inhibici zprostředkovanou proteiny IAP (Shiozaki et Shi, 2004). BIR2 a BIR3 domény u XIAP mnohonásobně zvyšují vazbu na protein Smac, bez těchto domén není XIAP inhibován (Srinivasula et Ashwell, 2008). Knockout proteinů Smac a XIAP v myších neprodukoval žádné očekávané fenotypy s defektem apoptotické dráhy, což se dá vysvětlit tím, že buňka obsahuje mnoho proteinů podobných IAP a Smac proteinům (Shiozaki et Shi, 2004).

3.1.5.2 Htr A2/Omi

Prekurzorem Htr A2/Omi je 50-kDa protein. HtrA2 se vyskytuje hlavně v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Nedávno bylo zjištěno, že bakteriální HtrA2 má dvojitou roli jako chaperon při normální teplotě, a jako aktivní proteáza při vysokých teplotách (Ravagnan et al., 2002). Omi stejně jako Smac je syntetizován jako prekurzor s N-terminální mitochondriální sekvencí. Když buňky prochází apoptózou, tyto molekuly bez N-terminální sekvence jsou uvolněny z intermembránového prostoru do cytosolu, kde se vážou na IAP BIR2 a BIR3 přes IAP-binding motif (IBM) (Srinivasula et Ashwell, 2008).

3.1.6 Proteiny rodiny Bcl-2

Rodina Bcl-2 proteinů (B cell leukemia/lymphoma-2) byla objevena v lymfomu (B cell lymfoma-2). Jako první byl objeven protein Bcl-2 podle něhož se rodina jmenuje (Sorenson, 2004). Bcl-2 proteiny se zaměřují za účelem indukce nebo inhibice apoptózy na odlišné intracelulární membrány. Mezi tyto membrány patří vnější mitochondriální membrána (MOM), membrána endoplazmatického retikula (ER) a také jaderná membrána. Většina endogenních Bcl-2 proteinů (kolem dvou třetin) je lokalizována na ER membráně a asociuje jadernou membránou. Zbývající proteiny jsou umístěny na vnější mitochondriální membráně MOM (Schinzel et al., 2004). Tyto proteiny představují důležitý kontrolní bod v apoptóze, působící proti nevratnému poškození buněk tím, že kontrolují uvolňování apoptogenních faktorů z mitochondrií (Danial, 2007). Do dnešní doby bylo objeveno přes 25 členů rodiny Bcl-2 proteinů (Petros et al., 2004). S objevením Bcl-2 proteinů byla nalezena nová skupina regulátorů buněčné smrti. Tyto regulátory na rozdíl od ostatních známých regulátorů nepodporují proliferaci, ale blokují nebo aktivují apoptózu (Danial 2007).

Troj-rozměrná struktura proteinů rodiny Bcl-2 se skládá ze dvou centrálních, převážně hydrofobních α -helixů, obklopených šesti nebo sedmi amfipatickými α -helixy s proměnlivou délkou. Jednotlivé proteiny tedy obsahují 8 až 9 α -helixů. U Bcl-2 proteinů byly identifikovány čtyři BH domény (BH1-4) a každý z členů Bcl-2 rodiny obsahuje alespoň jednu z těchto čtyř BH domén (Petros et al., 2004).

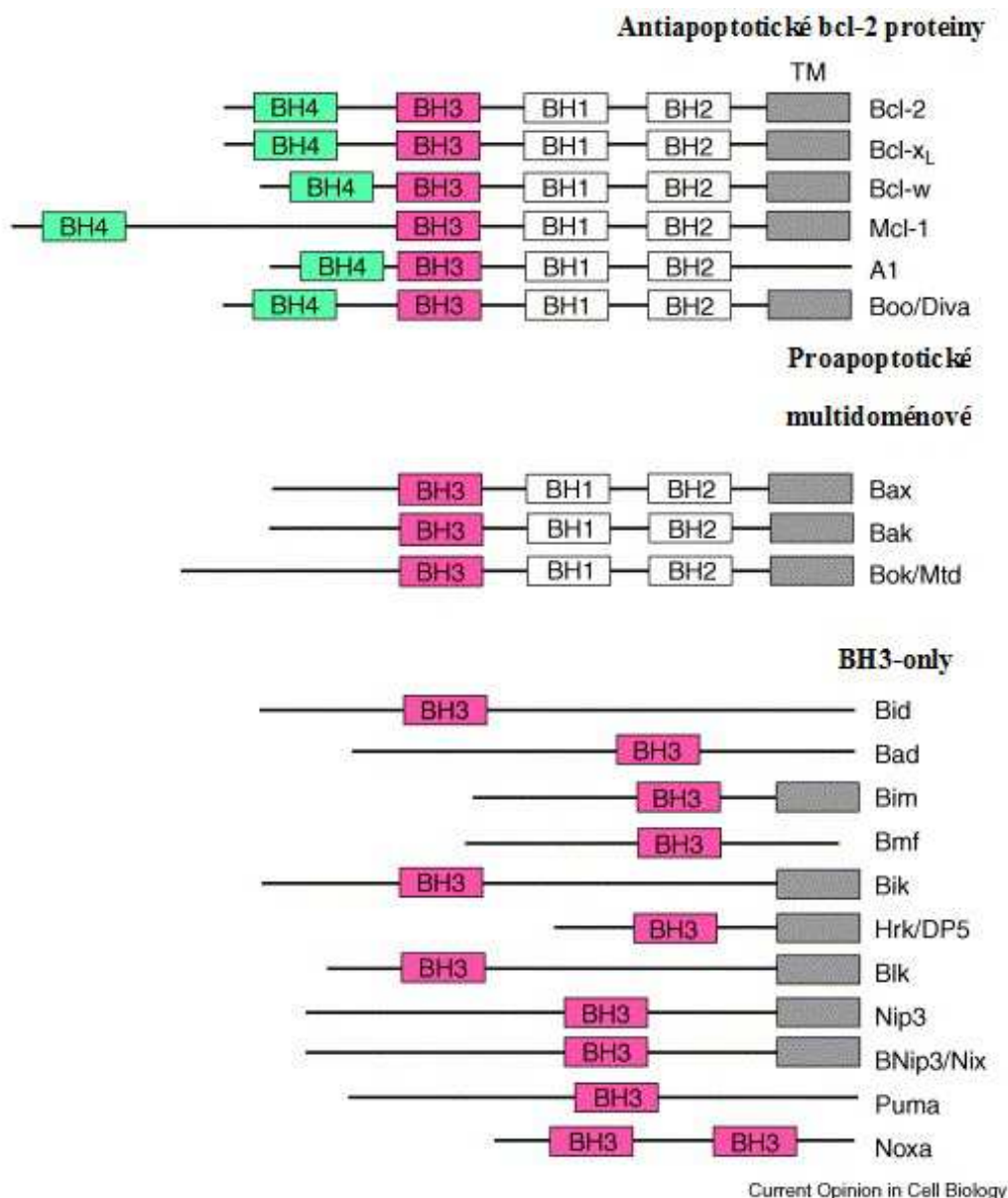
Bcl-2 proteiny se dělí na antiapoptotické, které chrání buňku před apoptózou a na proapoptotické, které se účastní indukce apoptózy. Proapoptotické se dále dělí na multidoménné a na BH3-only podle počtu BH domén (Kuwana et Newmeyer, 2003). Členové Bcl-2 rodiny jsou obsaženy ve vysoké míře v embryonálním vývoji, kde regulují množství buněk, což snižuje poporodní diferenciaci a dozrávání. (Sorenson, 2004). Některé proteiny se účastní kromě regulace apoptózy také dalších mechanismů buňky. Jako je glukózový metabolismus, kontrola buněčného cyklu a kontrola poškození DNA (Danial, 2007). Protein-proteinové interakce mezi Bcl-2 proteiny mohou sloužit jako cíl pro farmakologické manipulace fyziologickou dráhou buněčné smrti pro léčbu rakoviny a mnoha dalších onemocnění (Reed et al., 1996).

Nerovnováha mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny u mnoha forem rakoviny vede k neschopnosti reagovat na apoptotické stimuly, a tím k nashromáždění buněk (Petros et al., 2004). Pokud je redukována exprese proteinu Bcl-2 a exprese Bax proteinu je zvýšena, klesne potenciál mitochondriální membrány, a tím je porušena membránová

integrita (Sarkar et al., 2011). Rodina Bcl-2 proteinů také ovlivňuje dynamiku Ca^{2+} v ER. Změna hladiny Ca^{2+} v ER může mít vliv na indukci apoptózy. Vyšší hladina Ca^{2+} může vyvolat otevření vnitřní membrány mitochondrií a vytvoření „permeability transition pore“. To způsobí hromadění tekutiny a následnou rupturu mitochondrií a aktivaci apoptozy. Overexprese Bcl-2 nebo deficiencie Bax i Bak proteinu se projevuje nízkou hladinou Ca^{2+} v ER, a tím nízkým obsahem Ca^{2+} i v mitochondriích (Danial, 2007).

U Huntingtonovy nemoci byl k léčbě u potkanů použit Simvastatin. Ten vyvolává expresi antiapoptotického Bcl-2 proteinu a regulaci proapoptotického proteinu Bax, což snižuje apoptózu neuronů a zlepšuje prognózu onemocnění (Patassini et al., 2008).

Obrazek č. 2. Schématická klasifikace některých proteinů rodiny Bcl-2. (TM znamená hydrofobní oblast v C-terminální části u několika těchto proteinů, která byla původně považována za transmembránovou doménu. Není jasné, jestli zbytky těchto regionů skutečně usnadňují membránovou asociaci).



Převzato a upraveno z Kuwana et al., 2003.

3.1.6.1 Antiapoptické Bcl-2 proteiny

Antiapoptické proteiny chrání buňku před apoptózou tím, že inhibují aktivitu proapoptotických proteinů. Pokud jsou proapoptotické proteiny inhibovány, nedojde k permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c (Sarkar et al., 2011).

Tyto Bcl-2 proteiny jsou umístěny na několika intracelulárních membránách, kde kontrolují apoptózu (Schinzel et al., 2004). Mezi tyto membrány patří cytoplazmatický povrch jaderné membrány, membrána ER a vnější mitochondriální membrána (Willis et al., 2003; Schinzel et al., 2004). BHRF1 (proteiny z Epstein-Barrova viru) a KSHVBcl-2 (z Kaposiho sarkoma viru) jsou virové proteiny podobné antiapoptotickým Bcl-2 proteinům a obsahují totožné BH domény. Tyto proteiny ve virech jsou schopné zabránit apoptóze hostitelské buňky indukované poškozením DNA, což zajišťuje viru přežití a replikaci (Petros et al., 2004).

Protein Bcl-2 je protoonkogen, který se nachází na chromozomech v umístění t(14;18) (q32;q21). Byl objeven u maligního B lymfomu (B cell lymphoma-2) jako první protein z této rodiny, proto je po něm rodina pojmenovaná (Danial 2007). Bcl-2 protein tím, že blokuje apoptózu přispívá k expanzi rakovinných buněk (Schinzel et al., 2004). Expres Bcl-2 proteinu blokuje morfologické projevy apoptózy a je nutný pro to, aby byl nádor schopen přežít (Danial 2007).

Bcl-2 protein je lokalizován na endoplazmatickém retikulu, na vnější membráně mitochondrií a na jaderné membráně. Liší od ostatních proapoptotických Bcl-2 proteinů tím, že je vždy integrován do membrány, zatímco Bcl-xl a Bcl-w jsou také přítomné v cytoplazmě a volně připojené k membráně (Cook et al., 1999; Schinzel et al., 2004; Chauhan et al., 2007). Bcl-2 protein, umístěný na povrchu vnější mitochondriální membrány, působí proti fyziologickým mechanismům buněčné smrti, čímž zabraňuje indukci apoptózy (Reed et al., 1996; Fennell et al., 2008; Pedrera et al., 2012). Naváže se na aktivované proapoptotické členy Bcl-2 rodiny jako je Bax a Bak a blokuje jejich schopnost indukovat apoptózu (Fennell et al., 2008; Zhai et al., 2008; Pedrera et al., 2012). Bcl-2 protein a jeho homology hrají klíčovou roli v kontrole apoptózy a overexpresi proapoptotických Bcl-2 proteinů v buněčných liniích transgenických živočichů. To ukazuje, že jsou zapojeny do kontroly buněčné proliferace (Bonney-berard et al., 2004). Nízká hladina exprese Bcl-2 proteinu má za následek vyšší náchylnost k apoptóze (Pedrera et al., 2012). Skarkar et al., (2011) pozoroval, že vystavení buňky nanočásticím mědi up-reguluje protein Bax a down-reguluje Bcl-2 protein. Změny v poměru Bcl-2/Bax způsobily snížení mitochondriálního membránového potenciálu, vedoucího k uvolnění cytochromu c v cytosolu. Nanočástice mědi indukují ztrátu membránového potenciálu a expresi cytochromu c, Apaf-1 kaspázy-9 a kaspázy-3, čímž je aktivována vnitřní dráha buněčné smrti (Sarkar et al., 2011). Myši s knockoutem genu pro Bcl-2 protein jsou schopny přežít embryonální vývoj i několik měsíců po narození. Takové myši ale velmi rychle umírají na onemocnění „polycystic renal disease“ a ztrácí tmavý

pigment. Ledviny těchto myší procházejí rapidní apoptózou metanefrických buněk během rané embryogeneze a následně se na ledvinách formují hrubé cysty. Bcl-2 protein je tedy velmi důležitý pro správný embryonální vývoj ledvin a jejich schopnost dozrávat, i pro udržení buněk tmavého pigmentu (melanocytů). Bcl-2 $-/-$ myší podstupují involuci sleziny a brzlíku. Mnoho těchto myší vykazuje vysokou apoptózu v brzlíku a bílé dřeni sleziny. Takováto slezina obsahuje zralé T a B lymfocyty, což naznačuje, že dozrávání pokračuje i za absence Bcl-2 proteinu (Sorenson, 2004).

U non-hodgkinových folikulárních lymfomů byl nalezen defekt v genu kódujícím Bcl-2 protein. Bcl-2 gen je přesunut z normálního umístění na 18. chromozómu na 14. chromozóm. Tato mutace se objevuje u 90% mírného non-hodgkinova lymfomu (B-cell lymphoma -2) a u 30% více agresivního B-cell lymfomu (Reed et al., 1996).

Bcl-2 protein s odstraněnou BH4 doménou (aminokyseliny 10-30) se váže na Bax, Bik/nbk, Bak, Bad, Bid a Bim se stejnou afinitou jako wild type Bcl-2, ale je odstraněna jeho funkce zajišťující přežití buňky, není schopen zabránit apoptóze a zpomalovat buněčný cyklus (Sorenson, 2004). Bcl-2 homozigótní knockout u myší nebo Bax protein u transgenních myší se projeví zrychlením přechodu G1-S fáze, což je způsobeno nižší úrovní P27 a buňky jsou rychleji degradovány (Bonney-berard et al., 2004).

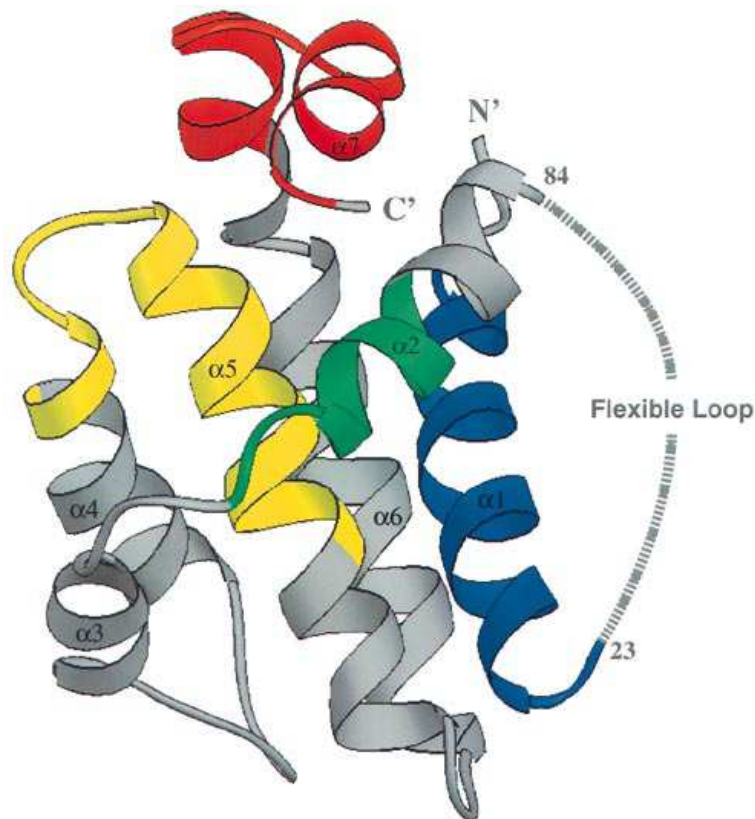
Protein Bcl-2 je odpovědný za rezistenci srdečních fibroblastů vůči apoptóze. Na druhé straně i přes nízkou hladinu Bcl-2 si stárnoucí buňky vytvářejí rezistenci vůči apoptóze, přestože u nich nebyly pozorovány žádné významné změny v poměrech mezi antiapoptotickými a proapoptotickými proteiny. Jejich rezistence může souviset s tím, že u nich neprobíhá buněčný cyklus, jelikož stárnoucích buňky jsou trvale pozastaveny v G₀/G₁ fázi buněčného cyklu (Stoka et al., 2006). Pozměněné hladiny Bcl-2 proteinu mohou být spojeny s MS cerebrální ischemií, mrtvicí a jinými neurodegenerativními onemocněními (Patassini et al., 2008). Overexprese Bcl-2 v srdci potkanů chrání srdeční myocyty od apoptózy (Cook et al., 1999). Bcl-2 protein hraje důležitou roli v regeneraci cév po ischemickém poškození. U laboratorních potkanů je akutní ischemické poškození charakterizováno dvěma vrcholy apoptózy. První malý vrchol (třetí den) je následován rapidním poklesem v procentech apoptotických buněk. Exprese Bcl-2 proteinu zůstává zvýšena na dobu 3 dní po ischemickém poškození, a pak se vrací na normální úroveň. Vyšší exprese Bcl-2 v průběhu počáteční fáze zotavení může usnadnit opětovnou epitelizaci, protože zabraňuje přílišnému odumírání zdravých buněk (Sorenson, 2004).

Overexprese Bcl-2 je velmi důležitá pro ochranu lymfocytů hlavně T-buněk, zatímco nízká hladina Bcl-2 proteinu je spojena s apoptózou folikulárních lymfocytů. BVDV (bovine viral diarrhoea virus) inokulovaná telata se vyznačují značnou lymfocytární apoptózou uvnitř folikulů, kde je Bcl-2 vzácný. Naopak v mezi folikulárním prostoru, kde jsou Bcl-2 buňky častější, je intenzita apoptózy nízká. Je tedy na dalším zkoumání, zda je Bcl-2 protein schopen chránit organismus před více virulentními kmeny BVDV (Pedrera et al., 2012).

Vyšší hladina Bcl-2 byla detekována v 80% nerozlišeného karcinomu nosohltanu (NPC). Bcl-2 protein je také odpovědný za chemorezistenci nádorů krku a hlavy. YC137 inhibitor Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-xl, výrazně snižuje proliferaci HK1 a CNE1 buněk, které mají vysokou hladinu Bcl-2 proteinu. Je zajímavé, že potlačená exprese Bcl-2 a léčba cisplatinou výrazně zvyšuje apoptózu v HK1 a CNE1 buňkách v porovnání s BCL-2 shRNA nebo cisplatinou samotnou. Při použití YC137 inhibitoru je u těchto buněčných typů vyšší citlivost na cisplatinou indukovanou apoptózu (Low et al., 2012).

Protein Bcl-x byl poprvé nalezen v DNA kuřete a je významným členem Bcl-2 rodiny, který hraje klíčovou roli v regulaci apoptózy (Chu et al., 1999; Sorenson, 2004). Struktura Bcl-xl je tvořena dvěma odlišnými izoformami, dlouhou izoformou Bcl-xl, ta funguje stejně jako u Bcl-2 proteinu a druhou krátkou izoformou, Bcl-xs, která Bcl-2 protein naopak inhibuje. Bcl-xl může indukovat významnou rezistenci vůči apoptotické buněčné smrti. Rezistence způsobená proteinem Bcl-xl je více přímá a silnější, než rezistence vytvářená proteinem Bcl-2 (Chu et al 1999). Bcl-xl má 233 aminokyselin a působí jako inhibitor buněčné smrti. Bcl-xl je exprimován hlavně postnatálně a je umístěn na mitochondriální membráně a na perinukleárním obalu. Zatímco Bcl-xs buněčnou smrt usnadňuje a má 170 aminokyselin. Bcl-xl je 5x až 6x více zastoupen v ledvinách, mozku a brzlíku savců než Bcl-2. Jeho exprese je vyšší také v játrech a v krevetvorných orgánech (Sorenson, 2004).

Obrázek č. 3. Struktura Bcl-xl: žlutá je BH1 doména, červená je BH2 doména, zelená je BH3 doména a modrá je BH4 doména.



Převzato z Liang et Fesik, 1997.

Celková struktura proteinu se skládá z osmi α -helixů a ty jsou spojeny do různých dlouhých smyček. Dva centrální helixy ($\alpha 5$ a $\alpha 6$) formují jádro proteinu. Tyto dva helixy jsou převážně hydrofobní a jsou obklopeny z jedné strany $\alpha 3$ a $\alpha 4$ helixy a z druhé strany $\alpha 1$ a $\alpha 2$ helixy (Petros et al., 2004). Bcl-xl je v buňce přítomný v cytosolu, nebo ve vnější mitochondriální membráně. Množství proteinu volného nebo navázaného na vnější mitochondriální membránu závisí na typu tkáně. Transmembránové domény Bcl-2 a Bcl-xl jsou obě dlouhé 19 aminokyselin a jsou podobně hydrofobní (Schinzel et al., 2004). Bcl-xl protein je schopný asociovat jak s Bid, tak tBid proteinem (Simmons et al., 2008).

Antiapoptotický Bcl-xl protein udržuje buňku na živu přes regulaci iontového gradientu tím, že zvýší citlivost aktivity iontového kanálu (Priyadarshi et al., 2010). Myši s Bcl-x^{-/-} umírají kolem 13. dne embryonálního vývoje. Takové myši mají zvýšenou apoptózu krvetvorných buněk v játrech, zkrácenou životnost nezralých lymfocytů a vysokou apoptózu postmitotických nezralých neuronů, vyvíjejícího se mozku a míchy. Pokud je deletován jak Bax, tak bcl-x protein, výrazně se zvyšují počty neuronů a schopnost jedince

přežít. Při normálním vývoji Bax a Bcl-xl proteiny regulují přežití nezralých neuronů tak, aby přežily jen ty životaschopné. To ukazuje, že Bcl-xl chrání neurony a zabraňuje vzniku ischemického poškození mozku (Sorenson, 2004).

Bcl-2 a Bcl-xl jsou obsaženy ve vysoké míře u novorozenců. Expres těchto proteinů je v průběhu vývoje organismu zachována. V některých typech buněk je Bak vázán a inhibován Mcl-1 a Bcl-xl, ale ne Bcl-2. (Danial, 2007). Bcl-2, Bcl-xl a Mcl-1 jsou vysoce zastoupeny u mnoha nádorů (Low et al., 2012). Bylo zjištěno, že antiapoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w a Mcl-1 podporují migraci a invazi potenciálně karcinogenních buněk. Mechanismy tohoto fenoménu zatím nejsou zcela objasněny (Kim et al., 2012).

Protein Bcl-w inhibuje buněčnou smrt. Je lokalizován na cytoplazmatické membráně jaderných obalů, na mitochondriích a na endoplazmatickém retikulu. Bcl-w není do vnější mitochondriální membrány integrován tak jako Bcl-2 (Schinzel et al., 2004). V tkáních se vyskytuje hlavně v mozku, míše, varlatech, v krvetvorných orgánech, fibroblastech, tlustém střevě, srdci, slinivce břišní, slezině a brzlíku. Expres nebyla nalezena v játrech, svalech nebo slinné žláze (Sorenson, 2004).

Bcl-w struktura má karboxyterminální α -helix, který je umístěn v hydrofobním žlábkou proteinu. Afinita vazby Bim na Bcl-w se zvyšuje trojnásobně po odstranění tohoto helixu. Tento helix je mnohem více pohyblivý než další α -helixy proteinu Bcl-w (Petros et al., 2004). Bcl-w podstupuje konformační změny, během kterých je C-terminální α -helix vychýlen, což umožňuje vazbu Bcl-w proteinu na vnější membránu mitochondrií. Bim a Bmf proteiny se mohou vázat na Bcl-w (Schinzel et al., 2004).

Delece Bcl-w proteinu u myši spolu s γ -zářením nebo lékem na rakovinu 5-fluorouracilem (5-FU) způsobí výrazné zvýšení apoptózy. Tato apoptóza se projevuje hlavně u epitelálních buněk krypt tlustého a tenkého střeva ve srovnání s wild type myši. Zatímco spontánní apoptóza bez indukce (5-FU) a γ -zářením zvýšena není. Bcl-w deficiencie u samců způsobuje sterilitu způsobenou ranou progresivní a kompletní degenerací varlat, ale nezpůsobuje žádné jiné vývojové vady (Lapham et al., 2009). Spermatogeneze ve varlatech vyžaduje rozvoj zárodečných buněk, podporovaný Sertolliho buňkami. Bcl-w je exprimován v sertolliho buňkách, ale v zárodečných buňkách ne, takže při jeho deficienci jsou odstraněny Sertolliho buňky a nedojde k rozvoji zárodečných buněk. U myši s deficiencí Bcl-w probýhala úplná ztráta zárodečných buněk od odstavu do 7 měsíců. Podobně u dospělých myši byly odstraněny i Leydigovy buňky (Sorenson, 2004). Bcl-w byl nalezen v mnoha nádorech jako je adenokarcinom žaludku a tlustého střeva a GBM (glioblastoma

multiforme) (Bae et al., 2012). V gastrointestinálním traktu je spojován s pokročilým stádiem onemocnění hlavně u nádoru tlustého střeva a s jeho schopností pronikat do jiných tkání (Lapham et al., 2009). Výsledky ukazují, že Bcl-w se účastní i podpory migrace nádorových buněk a jejich invaze přes dráhu zahrnující PI3K, Akt, Sp1 a MMP-2. Aby nádor mohl proniknout do sousední tkáně, je důležitá jeho motilita a degradace extracelulárního matrix. Degradaci extracelulární matrix podporuje Bcl-w přes PI3K-Akt-Sp1 dráhu, která aktivuje peptid MMP-2 (Bae et al., 2012). Bcl-W také může potlačovat stresem aktivované efektorkinázy a c-Jun NH2-terminální kinázy potřebné pro aktivaci apoptózy v některých buněčných systémech (Lapham et al., 2009).

Protein Mcl-1 je multidoménný antiapoptotický protein lokalizovaný na vnější mitochondriální membráně, kde interaguje a inhibuje Bak a Bax proteiny. Nedávný výzkum, zahrnující inhibitor translace cykloheximid, který indukuje apoptózu ukázal, že ztráta Mcl-1 proteinu je pro buňku kritická a vede k aktivaci Bim, Bax a Bak. Mcl-1 protein je upregulován v mnoha typech rakoviny (lymfomu, leukemie a myelomu) a podporuje rakovinné buněčné metastázy. Esenciální je pro přežití krvetvorných kmenových buněk, regulaci a udržení T a B buněk v embryogenezi (Kojima et al., 2010). Mcl-1 má strukturu totožnou s ostatními antiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2. Mcl1 inhibuje proteiny Bax, Bak a NOXA. BH3 doména Mcl-1 proteinu je schopná kvůli své specificitě interagovat jen s proteiny Bak a NOXA (Fennell et al., 2008). Protein Bax se na Mcl-1 protein váže velmi silně, silněji než protein Bak. (Zhai et al., 2008)

Lidský gen pro Mcl-1 protein se skládá z Mcl-1L, Mcl-1S a Mcl-1ES. Exony I-III tohoto genu kódují Mcl-1L, který působí antiapoptoticky. Proapoptotický Mcl-1S je kodován exonem II. Třetí součást mRNA genu Mcl-1 je proapoptotický Mcl-1ES, který je nejmenší (Kim et al., 2009). Ani jeden z těchto genů nebyl nalezen u myši (Kojima et al., 2010). Mcl-1ES protein se účastní regulace buněčné smrti a přežití. Změny v expresi endogenního Mcl-1ES proteinu nemusí být zaznamenány v důsledku nedostatku funkčních protilátek, ani v případě jeho overexprese. Schopnost buňky přežít výrazně klesá při overexpresi Mcl-1S a Mcl-1ES. Mcl-1L zvyšuje mitochondriální membránový potenciál, zatímco Mcl-1ES potenciál výrazně snižuje. Ko-exprese Mcl-1ES s Mcl-1L narušuje mitochondriální integritu porovnatelně s mírou vyvolanou overexpresí Bak a Bax proteinu. Zvýšení exprese Mcl-1ES proteinu způsobí uvolnění cytochromu c (Kim et al., 2009). U myši je Mcl-1 protein tvořen genem Mcl-1V, který se vyskytuje v normální i nádorové buněčné linii a tkáni. Mcl-1V je lokalizován v mitochondriích a inhibuje apoptózu indukovanou anoxií (nedostatkem

kyslíku ve tkáních) a antirakovinnými léky. Mcl-1V je v buňkách procházejících apoptózou rozkládán pomaleji než Mcl-1 (Kojima et al., 2010).

Mcl-1 je exprimován, na rozdíl od Bcl-2 a Bcl-xL, během celého buněčného cyklu s vrcholem v M-fázi. Bylo zjištěno, že knockout tkáňově specifického Mcl-1 proteinu vede k téměř úplnému odstranění krvetvorných buněk. Mcl-1 protein je také nezbytný pro přežití nervových prekursorových buněk (NPCs) u embryí. Knockout Mcl-1 v nervovém systému je pro embrya letální. Výsledky ukazují, že ztráta funkce Mcl-1 proteinů v dospělých NPC, jak in vitro, tak in vivo, způsobí apoptózu, zatímco obnovení funkce Mcl-1 proteinu způsobí pokles apoptózy. Což ukazuje, že Mcl-1 je zásadní pro přežití NPC i v dospělosti. To může být využito pro podporu přežití NPC a regeneraci neuronů při poškození mozku (Malone et al., 2012). Mcl-1 neutralizuje proapoptotický protein Bim, čímž zajišťuje přežití myelomových buněk. Mcl-1 má velmi krátký poločas rozpadu a je vysoce regulován jak na transkripční, tak na postranskripční úrovni. V krvetvorných buňkách růstový faktor podporuje přežití buňky tím, že spustí transkripci Mcl-1 proteinu a jeho stabilizaci. Down regulace Mcl-1 proteinu je důležitá pro narušení Bim/Mcl-1 komplexu a pro indukci apoptotické aktivace myelomových buněk (Wuillème-Toumi et al., 2007). Mcl-1 je upregulován během cytokinem indukovaného zpoždění apoptózy neutrofilů (Madsen-Bouterse et al., 2006).

Protein A1, neboli **BF11**, je antiapoptotický protein, který selektivně interaguje s Bak a tBid, ale ne s proteiny Bax a Bid. Protein A1 blokuje ligand TNF α , který nepřímo aktivuje Bax přes asociaci s tBid proteinem. Odstranění C-terminální domény A1 proteinu snižuje jeho interakci s Bak a tBid proteinem. Tím se snižuje schopnost A1 proteinu potlačovat buněčnou smrt indukovanou těmito proteiny (Simmons et al., 2008). A1 je transkripčně cílen na nukleární faktor kB (NF-kB), který potlačuje apoptózu v odpovědi na několik stimulů indukujících apoptózu jako je TNF α a staurosporin (Simmons et al., 2008). Exprese BF11 (A1) nebyla nalezena v nervovém systému savců (Malone et al., 2012). Odstraněním funkce A1 proteinu je apoptóza akcelerována, což koresponduje se snížením akutní zánětlivé odpovědi. A1 protein je silně antiapoptotický a jeho overexprese může zachránit před apoptózou buněčnou linii s defektem nukleárního kB faktoru. Upregulaci proteinu A1, zprostředkovanou přes glukokortikoidovou receptorovou aktivaci, způsobuje steroid Dexametazon (Madsen-Bouterse et al., 2006).

Protein Bcl-B je antiapoptotický člen Bcl-2 rodiny. Tento protein změní svůj fenotyp po navázání na volný nukleární receptor Nur77/TR3 a jeho funkce se změní z antiapoptotického proteinu na protein proapoptotický. Bcl-B je také známý jako Bcl2-L-10 nebo Nrh. Je to lidský ortolog proteinu Boo/Diva a nese charakteristický BH1 sekvenční motiv „TWGR“ (Rautureau et al., 2010).

Bcl-B je posledním objeveným antiapoptotickým proteinem, takže jeho funkce jsou méně prozkoumané (Krajewska et al., 2008; Zhai et al., 2003). Obsahuje všechny 4 BH domény a také COOH terminální transmembránovou doménu. COOH doména je cílená, jako u ostatních Bcl-2 proteinů, na membránu mitochondrií. Bcl-B ortolog u myši disponuje jak antiapoptotickou, tak proapoptotickou aktivitou v závislosti na průběhu apoptózy v dané buňce. Exprese Bcl-B je spojena se špatnou prognózou u nádoru prsu a tlustého střeva. Bcl-B protein je spojen také s vyšším výskytem úmrtí u rakoviny prostaty a u SCLC (small cell lung cancer), což naznačuje, že Bcl-B může přispívat k agresivitě nádoru. Jeho výskyt ale nebyl nalezen u nádoru děložního čípku a vaječníků, takže u těchto nádorů není příčinou jejich malignosti (Krajewska et al., 2008).

Zhai et al., (2003) zjistili, že Bcl-B protein je schopen vázat a regulovat jen buněčnou smrt indukovanou Bax proteinem. Bcl-B i Mcl-1 silně preferují vazbu na BH3 doménu proteinu Bax a o něco méně se vážou na BH3 doménu Bak proteinu. Pro Bcl-B je důležitá dimerizace BH3 domény Bax a Bak proteinů. U mutantů těchto proteinů, kteří mají vyměněné BH3 domény, je Bcl-B protein schopen vázat a blokovat jen Bak protein, protože mutant Bak proteinu má BH3 doménu Bax proteinu (Zhai et al., 2003).

Bcl-B protein váže Bcl-2, Bcl-XL a Bax proteiny. Delece transmembránové domény Bcl-B proteinu narušuje asociaci s intracelulárními organelami a snižuje antiapoptotickou funkci tohoto proteinu. Bcl-B disponuje unikátním typem selektivity pro vazbu a regulaci funkce dalších členů Bcl-2 rodiny. Overexprese Bcl-B neindukuje apoptózu, ani neruší supresi apoptózy způsobenou overexpresí Bcl-2 nebo Bcl-XL, což ukazuje, že Bcl-B není výhradně proapoptický protein, proto je stále zařazen mezi antiapoptotické proteiny (Ke et al., 2001).

Protein Boo/Diva je antiapoptotický protein a stejně jako Bcl-B v určitých situacích působí jako proapoptotický protein (Naumann et al., 2001). Boo/Diva se vyskytuje u myši a je blízkým ortologem Bcl-B se shodnou ve 49 % aminokyselin. Struktura Boo je složena ze sedmi amfipatických helixů. Plně dlouhý Boo/Diva protein je nerozpustný (Rautureau et al., 2010). Boo/Diva podporuje buněčný cyklus v buňkách lidského gliomu v reakci na deprivaci séra a inhibuje apoptózu indukovanou v těchto buňkách přes CD95 ligand nebo

chemoterapeutické látky. Byla identifikována jeho proapoptotická funkce, kdy k indukci apoptózy nepotřebuje BH3 doménu. Díva inhibuje asociaci Bcl-xL a Apaf-1 přes přímé interakce s Apaf-1, čímž je antagonist antiapoptotické aktivity Bcl-xL proteinu (Naumann et al., 2001).

Jeho exprese je u myší omezena na vaječníky a varlata, což ukazuje, že u myší tento protein funguje odlišně než Bcl-B u lidí (Krajewska et al., 2008). Boo/Diva protein je častý ve vaječnicích, ale v ostatních tkáních je jeho exprese u myší nízká. Jeho knockout nezpůsobuje žádné výrazné fenotypy, což naznačuje, že jeho funkce je pouze redundantní. Boo/Diva způsobuje rezistenci k indukci apoptózy, což ukazuje na jeho funkci jako antiapoptotického proteinu. (Rautureau et al., 2010).

3.1.6.2 Proapoptotické multidoménné Bcl-2 proteiny

Proapoptotické multidoménné proteiny se účastní aktivace apoptózy (Sarkar et al., 2011). Proteiny jako Bax a Bak indukují apoptózu porušením vnější mitochondriální membrány, což dovoluje uvolnění faktorů jako je cytochromu c (Willis et al., 2003). Jejich proapoptotická funkce je blokována antiapoptotickými proteiny jako je Bcl-2 (Klener et al., 2010). BH3-only proteiny podporují multidoménné proapoptotické Bcl-2 proteiny při indukci apoptózy (Kuwana et al., 2003).

Bax je proapoptotický protein, který je v buňce volně v cytosolu nebo je umístěn na endoplazmatickém retikulu a volně připojen k vnější membráně mitochondrií. Ve zdravých buňkách je více jak 60% proteinu Bax volně v cytosolu a při aktivaci apoptózy je následně translokován a vložen do vnější membrány mitochondrií (Schinzel et al., 2004; Danial, 2007). Bax a Bak mohou být aktivovány i BH3-only proteiny (Fennell et al., 2008). Vazba BH3-only proteinů může podporovat membránovou translokaci cytosolického Bax proteinu do mitochondriální membrány (Willis et al., 2003).

Bax má sedm amfipatických α -helixů shluklých kolem dvou centrálních, většinou hydrofobních, α -helixů. Stejně jako antiapoptotické proteiny má Bax dlouhou nestrukturovanou smyčku spojující $\alpha 1$ s $\alpha 2$ helixy. Helixy 2, 3 a 4 mají stejnou relativní orientaci jako u Bcl-xL proteinu a tvoří hydrofobní žlábek (Petros et al., 2004). N- i C-terminální domény Bax proteinu jsou potřebné pro jeho připojení na vnější

mitochondriální membránu. N-terminální sekvence je složena z 20-37 aminokyselin. Posledních 23 aminokyselin u proteinu Bax tvoří transmembránovou doménu a jsou nezbytné pro připojení Bax proteinu do vnější mitochondriální membrány. Bif (bax interacting factor) je faktor, který podporuje translokaci Bax proteinu z cytosolu do mitochondrií. Tato translokace probíhá po indukci apoptózy, která způsobí konformační změny Bax proteinu (Schinzel et al., 2004). Během aktivace apoptózy jsou proteiny Bax a Bak aktivovány a prodělávají několikanásobné konformační změny (Danial, 2007). Proteiny Bax a Bak jsou inhibovány antiapoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny, což zabraňuje indukci buněčné smrti (Zhai et al., 2008). Bylo také popsáno, že Bax snižuje stabilitu lipidové dvojvrstvy přes pokles napětí uvnitř membrány, což vede k vytvoření hydrofilních pórů uvnitř lipidové membrány (Danial, 2007).

Delece Bax nebo Bak proteinu tvoří jen mírné abnormality, ale delece obou proteinů způsobuje akumulace nadbytečné tkáně (Willis et al., 2003). Při deficienci Bax proteinu dochází k nárůstu počtu thymocytů, B-buněk, T-buněk, ke zvětšení sleziny a také dochází k nárůstu počtu sympatických a motorických neuronů. U samců myši Bax^{-/-} jsou varlata atrofovaná a nedochází k tvorbě spermií. Zatímco u samic jsou reprodukční funkce relativně normální, ale přece jen je snížena ovariální životaschopnost. V dospělosti je Bax exprimován zvláště v ledvinách, játrech a pankreatu, který obsahuje málo nebo skoro žádný protein Bcl-2. V lymfatických uzlinách je exprese Bax proteinu vysoká, protože zde nefunkční lymfocyty podléhají apoptóze (Sorenson, 2004). Mutace genu pro Bax protein byla nalezena v 50 % nádoru tlustého střeva a gastrického nádoru (Danial, 2007). Bax je schopen tvořit heterodimery s Bcl-2 a Bcl-x. Rozdílné role Bax a Bcl-2 proteinů jsou dobře znatelné v ledvinách, podléhajících ischemii. Bax zde aktivuje apoptózu, zatímco Bcl-2 ji snižuje, a tím zmenšuje poškození ischemické tkáně a zlepšuje její následnou regeneraci. (Sorenson, 2004). Bax je v buňkách schopen regulovat antiproliferační efekt Bcl-2 proteinu (Bonney-berard et al., 2004). Hladinu Bax proteinu v nádorech, a tím i aktivaci apoptózy zvyšuje Carnosic acid (CA) a polyphenolic diterpen z rozmarýnu. Tyto látky působí jako léčba na androgenech nezávislého nádoru prostaty PC-3. Během léčby se zřetelně zvyšuje hladina Bax a jeho hladina je optimální mezi 24 a 36 hodinami po podání CA (Kar et al., 2012).

Overexpresi Bax nebo Fas proteinu je stimul pro indukci apoptózy. Ukázalo se, že Bax indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií a proto je prostředkem který indukuje dráhu přes Apaf-1/kaspázu-9 (Tamm et al., 1998). U Bax transgenních myši při overexpresi Bax proteinu v T buňkách poklesl počet cyklujících thymocytů a zralých T buněk

vstupujících do S fáze. Tento účinek je spojen s poklesem hladiny cyklicky závislých kináz (cyclin-dependent kinase) a inhibitoru p27kip1 (Bonney-berard et al., 2004).

Protein Bak je stejně jako Bax protein proapoptotický. Bak protein je umístěn na vnější mitochondriální membráně nebo na endoplazmatickém retikulu (Fennell et al., 2008; Schinzel et al., 2004). S Bak proteinem interaguje BH1 a BH2 doména z Bcl-xl proteinu a způsobuje jeho heterodimerizaci. Bak se váže na hydrofobní žlábk na povrchu proteinu Bcl-X_L a přebírá jeho amfipatický α -helix (Petros et al., 2004). Oligomerizace a aktivita proteinu Bak je nejvíce inhibována proteiny Mcl-1 a Bcl-xL a to hlavně ve zdravých buňkách (Danial, 2007).

Bak je blízce příbuzný Bax proteinu a jeho delece se neprojevuje žádnými vývojovými abnormalitami. Je možné, že funkce Bak proteinu je nadbytečná, protože při jeho deleci nevznikají žádné anomálie, ale pokud je odstraněn spolu s Bax proteinem, vzniká velké množství nadbytečné tkáně (Sorenson, 2004). Bak protein je důležitý pro správnou obnovu a nárůst klků střeva. Celiakie je charakteristická apoptózou enterocytů a rozvojem lézí. Hladiny Bak proteinu u onemocnění celiakie vzrůstají, a tím se zvyšuje i apoptóza epiteliálních buněk střeva a tvorba lézí. Pokud je exprese Bak v pořádku, epitel narůstá od úpatí klku. Hladiny ostatních proteinů u celiakie, jako je Bcl-2 a Bax, byly normální (Sorenson, 2004). Bad a Bax proteiny jsou prezentovány vysokou hladinou v srdeční tkáni novorozených potkanů. Naproti tomu v srdci dospělých potkanů nebyly Bad a Bax detekovány prakticky vůbec (Cook et al., 1999).

Heath-Engel et al., (2012) zkoumali roli Bax a Bak v buněčné smrti indukované p20Bap31. V ledvinách myši s dvojitým knockoutem wild type Bax/Bak proteinu. Zjistili, že exprese p20Bap31 vede k iniciaci buněčné smrti podobné neapoptotické parapoptóze v obou případech knockoutu (Heath-Engel et al., 2012). Bak/Bax double knockout u myši vykazuje zvýšení počtu neutrofilů v krvi a několik vývojových vad vedoucích k prenatalní smrti (Madsen-Bouterse et al., 2006).

3.1.6.3 Proapoptotické BH3-only proteiny

BH3-only proteiny jsou proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny. BH3-only proteiny regulují vnitřní a vnější signální dráhu apoptózy a signál převádí do mitochondrií, kde potom dále potlačují antiapoptotické proteiny nebo jsou schopny i aktivovat proteiny Bax a Bak.

Většina těchto proteinů je asociována s cytoskeletem a nebo jsou volné v cytoplazmě. BH3-only proteiny nejsou schopny indukovat apoptózu v buňkách, kde chybí jak Bax, tak Bak protein (Adams et Cory, 2007). Jsou významnými mediátory stresových signálů, pocházejících z vnějšího prostředí buňky jako osmotického a tepelného šoku (Klener et Klener, 2010). Proapoptotické BH3-only proteiny BAD, BID, BIM, NOXA, BIK, HRK, a PUMA mají pouze jeden helikální segment. Tento segment je minimální vazebné místo nutné pro to, aby mohly vázat multidoménové členy Bcl-2 rodiny (Danial, 2007). Různé BH3-only proteiny u savců se účastní různých signalizačních stresových drah. Pokud nejsou tyto signální dráhy poškozeny, BH3-only proteiny jsou volné pro vazbu a inaktivaci antiapoptotických Bcl-2 proteinů (Willis et al., 2003). BH3-only proteiny mají BH3 doménu a některé proteiny jako Bik, Hrk, Blk a Bim i C-koncovou hydrofóbní transmembránovou doménu. C-koncová hydrofóbní doména během apoptózy asociuje s membránami. BH3-only proteiny jako je tBid, Bim a Puma spouštějí konformační aktivaci proteinů Bax a Bak, zatímco ostatní jako je Bad, Noxa a Bik izolují antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny a neutralizují jejich schopnost inhibovat apoptózu (Fennell et al., 2008; Simmons et al., 2008). Když se BH3-only proteiny navážou na antiapoptotické Bcl-2 proteiny, uvolní proteiny Bax a Bak z inhibice, a ty mohou indukovat apoptózu (Klener et Klener, 2010).

BH3-only proteiny jsou tedy v přímé indukci apoptózy závislé na asistenci multidoménových proapoptických Bcl-2 proteinů. Také je důležitá schopnost těchto proteinů vázat a inhibovat antiapoptotické proteiny. Některé BH3-only proteiny, zahrnující Noxa, Puma/Bbc3, Bim, Hrk/Dp5, jsou transkripčně aktivovány proteinem p53, který indukuje apoptózu. Tyto proteiny regulují interakce mezi antiapoptotickými a proapoptotickými členy Bcl-2 rodiny přes jejich heterodimerizaci s antiapoptotickými. To umožňuje, aby byly proteiny Bax a Bak plně aktivovány (Fennell et al., 2008). Protein Bid je proteolyticky štěpen aktivovanou kaspázou-8 a u proteinu Bad probíhá jeho fosforylace (Schinzel et al., 2004). V biochemických a genetických studiích bylo zjištěno, že BH3-only proteiny fungují jako spouštěče buněčné smrti (Willis et al., 2003).

Protein Bid je normálně přítomen v cytosolu v inaktivní formě. Jeho aktivace proběhne až po proteolytickém zpracování aktivovanou kaspázou-8 (Petros et al., 2004). Granzym B dokáže štěpit Bid k vytvoření 14-kDa granzymem aktivovaného tBid proteinu, který je translokován do mitochondrií a spolupracuje s Bax proteinem (Schinzel et al., 2004). Aktivovaný tBid je translokován na mitochondrie a slouží k propojení signálu přes FAS receptory s vnitřní dráhou mitochondrií. Při absenci smáčedla se jediné aktivovaný tBid váže

na Bcl-xl Bid protein, který má dva centrální, většinou hydrofóbní, α -helixy, obklopené šesti amfipatickými helixy (Petros et al., 2004). Fosforylace Bid proteinu kaseinovou kinázou I a II zabráňuje jeho translokaci do mitochondrií (Schinzel et al., 2004).

Bid BH3 mutant je sice neschopný vázat antiapoptotické molekuly, ale dokáže aktivovat Bax protein, který uvolní cytochrom c, a tím je indukována apoptóza. To ukazuje, že primární mechanismus, kterým BH3-only proteiny aktivují apoptózu, nevyžaduje jejich asociaci s antiapoptotickými proteiny (Bcl-2, Mcl-1 nebo Bcl-xL) (Danial, 2007). Pokud je pozměněno více signálních kontrolních bodů dráhy, apoptotický signál je zesílen při oddělení receptorů smrti od Bid proteinu (Madsen-Bouterse et al., 2006).

Protein Bad váže a inhibuje jen Bcl-xl, Bcl-2 a Bcl-w. Na Bcl-xl protein se váže s mnohem menší afinitou než protein Bak. Bylo zjištěno, že aby vazba Bad proteinu byla pevnější, je třeba pět dalších reziduí na aminoterminální části a čtyři rezidua na karboxy terminální části (Petros et al., 2004). V buněčné kultuře je Bad protein regulován různými kinázami, které jsou antiapoptotické. Tyto Kinázy způsobují fosforylaci serinových reziduí proteinu Bad. Fosforylace serinových reziduí podporuje interakci se 14-3-3 „scaffold“ proteinem a jeho izolaci v cytosolu. Význam fosforylace Bad proteinu je zdůrazněn fenotypem myši s knock-in proteinu Bad. Tyto myši nejevily žádné známky abnormality, ale byly hypersenzitivní k různým apoptotickým stresům. Ve vápníkem indukované apoptóze bylo dokázáno, že defosforylace Bad proteinu ho disociuje z vazby na 14-3-3 protein a dovoluje jeho translokaci a interakci s Bcl-xl proteinem. Štěpení 14-3-3 proteinu kaspázou-3 usnadňuje aktivaci Bad (Willis et al., 2003; Schinzel et al., 2004; Danial, 2007).

Protein Bim působí jako hlavní aktivátor proteinů Bax a Bak. Ztráta proteinu Bim zajišťuje ochranu mitochondriální membrány před Bak a Bax proteiny. Proapoptotická aktivita Bim proteinu je regulována jak na transkripční, tak i post-transkripční úrovni. Na transkripční úrovni je Bim protein regulován antiapoptotickými i proapoptotickými cytokiny, také fosforylací BimEL. Protein Bim se váže s Mcl-1, oba proteiny jsou lokalizovány na mitochondriální membráně. Blokace Mcl-1 proteinu Bim proteinem zprostředkovává mitochondriální apoptotickou kaskádu (Wuilléme-Toumi et al., 2007). Ve zdravých buňkách jsou Bim a Bmf proteiny vázány do cytoskeletárních struktur. V reakci na apoptotický stimul a v interakci s multidoménovými Bcl-2 proteiny jsou tyto proteiny uvolněny a translokovány do mitochondrií. Bim protein tvoří tři hlavní isoformy: Bim_{EL}, Bim_L, a Bim_S. Disociace Bim_L proteinu umožňuje jeho translokaci do vnější membrány

mitochondrií, membrány endoplazmatického retikula a jaderných membrán, kde spolupracuje s ostatními proteiny Bcl-2 rodiny (Schinzel et al., 2004).

Protein Bik (také znám jako NBK) je vnitřně nestrukturovaný BH3-only protein, patřící mezi senzitivátory. Senzitivátory jsou BH3-only proteiny, které usnadňují aktivaci apoptózy přes inhibici antiapoptotických proteinů, ale nejsou schopni aktivovat proapoptotické proteiny. Zprostředkovává aktivaci apoptózy přes přímou interakci a inhibici Bcl-2 a Bcl-xL proteinu. Pokud jsou inhibovány antiapoptotické Bcl-2 proteiny, Bax protein může zprostředkovat aktivaci vnitřní dráhy apoptózy. Exprese Bik proteinu nebyla nalezena v buňkách ledvinového nádoru. Bik protein je lokalizován převážně na endoplazmatickém retikulu, na které se připojuje přes COOH terminální doménu. Odčerpání vápníku z endoplazmatického retikula je způsobeno overexpresí proteinu Bik. Buňky s dvojitým knockoutem Bax a Bak jsou rezistentní k uvolnění vápníku z endoplazmatického retikula indukovaného proteinem Bik. Indukce apoptózy Bik proteinem stimuluje konformační změny struktury proteinu Bax, což je nutné pro indukci apoptózy. Bortezomib (Velcade, PS341) proteazómový inhibitor, který se používá k léčbě mnoha myelomů, přímo reguluje hladinu exprese proteinu Bik. Upregulace Bik je indukována přes další proteazómové inhibitory, jako je MG132 nebo ALLN. Upregulace také zvyšuje senzitivitu proteinu Bik k receptoru TRAIL (Fennell et al., 2008).

Protein Noxa je schopen účinně vázat a blokovat jen proteiny Mcl-1 a A1 (Adams et Cory, 2007). Pokud jsou u myši knockoutovány proteiny Noxa a Bax, nedojde k aktivaci apoptózy zprostředkované proteinem Noxa, a to ani v případě, že došlo k poškození DNA. Také bylo zjištěno, že Noxa je schopná zprostředkovat uvolnění cytochromu c i za nepřítomnosti proteinu Bax (Fennell et al., 2008).

4 Závěr

Apoptóza je velmi důležitá při regulaci buněk v organismu, ať během prenatálního vývoje, nebo v postnatálním vývoji jedince. Poškození jejího signálu je příčinou mnoha onemocnění. Při nadměrné apoptóze umírá velké množství i zdravých buněk, jako tomu je u autoimunitních a neurodegenerativních onemocnění. Zatímco pokud jsou poškozeny dráhy indukce apoptózy a k apoptóze nedochází, dochází k hromadění buněk. To je příčinou vzniku nádorových onemocnění. Rodina proteinu Bcl-2 reguluje vnější i vnitřní apoptotickou dráhu a její proteiny působí jak proapoptoticky, tak i antiapoptoticky. Antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 jsou považovány, kvůli jejich schopnosti zabránit apoptóze, za příčiny nádorových onemocnění. Ovšem pokud jsou všechny proteiny v rovnováze a správně funguje několikanásobná kontrola apoptózy, umírají poškozené buňky a zdravé přežívají.

5 Seznam použité literatury

- Adams, J. M., Cory, S. 2007. Bcl-2-regulated Apoptosis: Mechanism and Therapeutic Potential. *Current Opinion in Immunology*. 2007 (19). 488-496.
- Bae, I. H., Yoon, S. H., Lee, S. B., Park, J. K., Ho, J., Um, H. 2009. Signaling Components Involved in Bcl-W-induced Migration of gastric cancer cells. *Cancer Letters*. 2009 (277). 22-28.
- Baláž, V., Kolář, F., Lišková, J., Pluhařová, A., Synek, P. 2008. Smrt jako součást života. MŠMT. Praha. 83 s. ISBN: 9788086784649
- Bonnefoy-Berard, N., Aouacheria, A., Verschelde, C., Quemeneuer, L., Marcais, A., Marvel, J. 2004. Control of Proliferation by Bcl-2 Family Members. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004 (1644). 159-168.
- Cook, S. A., Sugden, P. H., Clerk, A. 1999. Regulation of Bcl-2 Family Proteins During Development and in Response to Oxidative Stress in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*. 1999 (85). 940-949.
- Danial, N. N. 2007. Bcl-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clinical Cancer Research*. 13 (24). 7254-7263.
- Fennell, D. A., Chacko, A., Mutti, L. 2008. Bcl-2 Family Regulation by the 20S Proteasome Inhibitor Bortezomib. *Onkogene*. 2008 (27). 1189-1197.
- Heath-Engel, H., Wang, B., Gordon, C. S. 2012. Bcl-2 and the Endoplasmic Reticulum: a Bax/Bak-independent Paraptosis-like Death Pathway Initiated via p20Bap31. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012 (1823). 335-347.
- Huang, C., Chen, X., Guo, B., Huang, W., Shen, T., Sun, X., Xiao, P., Zhou, Q. 2012. Induction of Apoptosis by Icaricidin II through Extrinsic and Intrinsic Signaling Pathways in Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Cell*. 76 (7). 1322-1328.

- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N., Anderson, K. C. 2007. A Novel Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w Inhibitor ABT-737 as Therapy in Multiple Myeloma. *Oncogene* 2007 (26). 2374-2380
- Chu, W., Aguilera, N. S. I., Wei, M. Q., Abbondanzo, S. L. 1999. Antiapoptotic Marker, Bcl-XL, Expression on Reed-Sternberg Cells of Hodgkin's Disease using a Novel Monoclonal Marker, YTH-2H12. *Human pathology*. 1999 (9). 1065-1070.
- Jacobson, M. D., Weill, M., Raff, M. C. 1997. Programed Cell Death in Animal Development. *Cell* 1997 (88). 347-354.
- Kar, S., Palit, S., Ball, W. B., Das, P. K. 2012. Carnosic Acid Modulates Akt/IKK/NF- κ B Signaling by PP2A a Induces Intrinsic Pathway Mediated Apoptosis in Human Prostate Carcinoma PC-3 Cells. *Apoptosis*. 2012 (17). 735-747.
- Ke, N., Godzik, A., Reed, J. C. 2001. Bcl-B, a Novel Bcl-2 Family Member That Differentially Binds and Regulates Bax and Bak. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (16). 12481-12484.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972 (26). 239-257.
- Kim, E. M., Kim, J., Park, K. J., Hwang, S., Kim, W., Lee W., Kang S. W., Um H. 2012. Bcl-w Promotes Cell Invasion by Blocking the Invasion-suppressing Action of Bax. *Cellular Signalling*. 2012 (24). 1163-1172.
- Kim, J., Sim, S., Ha, H., Ko, J., Lee, K., Bae, J. 2009. Mcl-1ES, a Novel Variant of Mcl-1, Associates with Mcl-1L and Induces Mitochondrial Cell Death. *FEBS Letters*. 2009 (583). 2758-2764.
- Klener, P., Klener, P. jr. 2010. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie. Grada Publishing. Praha. ISBN:9788024728087.

- Kojima, S., Hyakutake, A., Koshikawa, N., Nakagawara, A., Takenaga, K. 2010. Mcl-1V, a Novel Mouse Antiapoptotic Mcl-1 Variant, Generated by RNA Splicing at a Non-canonical Splicing Pair. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010 (391). 492-497.
- Krajewska, M., Kitada, S., Winter, J. N., Variakojis, D., Lichtenstein, A., Zhai, D., Cuddy, M., Huang, X., Luciano, F., Baker, C. H., Kim, H., Shin, E., Kennedy, S., Olson, A. H., Badzio, A., Jassem, J., Meinhold-Heerlein, I., Duffy, M. J., Shimmer, Schimmer, A., D., Tsao, M., Brown, E., Sawyers, A., Andreeff, M., Marcola, D., Krajewski, Stan., Reed, J. 2008. Bcl-B Expression in Human Epithelial and Nonepithelial Malignancies. *Clinical Cancer Research*. 2008 (14). 3011-3021.
- Kuwana, T., Newmeyer, D. D. 2003. Bcl-2-family Proteins and the Role of Apoptosis. *Current Opinion in Cell biology*. 2003 (15). 691-699.
- Lapham, A., Adams, J. E., Paterson, A., Lee, M., Brimmell, M., Packham, G. 2009. The Bcl-W Promoter is Activated by β -catenin/TCF4 in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Gene*. 2009 (432). 112-117.
- Liang, H., Fesik, S. W. 1997. Free-dimensional Structures of Proteins Involved in Programmed Cell Death. *Journal of Molecular Biology*. 1997 (274). 291-302.
- Low, S. Y., Tan, B. S., Choo, H. L., Tiong, K. H., Khoo, A. S., Leong, C. 2012. Suppression of Bcl-2 Synergizes Cisplatin Sensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cancer letters*. 2012 (314). 166-175.
- Madsen-Bouterse, S. A., Rosa, G. J. M., Burton, J. L. 2006. Glucocorticoid Modulation of Bcl-2 Family Members A1 and Bak during Delayed Spontaneous Apoptosis of Bovine Blood Neutrophils. *Endocrinology*. 147 (8). 3826-3834.
- Malone, C. D., Hasan, S. M. M., Roome, R. B., Xiong, J., Furlong, M., Opferman, J. T., Vanderluit, J. L. 2012. Mcl-2 Regulates the Survival of Adult Neural Precursor Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2012 (49). 439-447.

- Naumann, U., Weit S., Wischhusen, J., Weller, M. 2001. Diva/Boo is a Negative Regulator of Cell Death in Human Glioma Cells. *FEBS Letters*. 2001 (505). 23-26.
- Patassini, S., Giampa, C., Martorana, A., Bernardi, G., Fusco, F. R. 2008. Effects of Simvastatin on Neuroprotection and Modulation of Bcl-2 and Bax in the Rat Quinolinic Acid Model of Huntington's Disease. *Neuroscience Letters*. 2008 (448). 166-169.
- Pedrera, M., Gomez-Villamandos, J. C., Risalde, M. A., Molina, V., Sánchez-Cordón, P. J. 2012. Characterization of Apoptosis Pathways (Intrinsic and Extrinsic) in Lymphoid Tissues of Calves Inoculated with Non-cytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Genotype-1. *Journal of Comparative Pathology*. 2012 (146). 30-39.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W. 2004. Structural Biology of the Bcl-2 family of Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004 (1644). 83-94.
- Priyadarshi, A., Roy, A., Kim, K., Kim, E. E., Hwang, K. Y. 2010. Structural Insights into Mouse Anti-apoptotic Bcl-x1 Reveal affinity for Beclin 1 and Gossypol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010 (394). 515-521.
- Rautureau, G. J. P., Day, C. I., Hinds, M. G. 2010. The Structure of Boo/Diva Reveals a Divergent Bcl-2 protein. *Wiley InterScience*. 78 (9). 2181-2186.
- Ravagnan, L., Roumier, T., Kroemer, G. 2002. Mitochondria, the Killer Organelles and Their Weapons. *Journal of Cellular physiology*. 2002 (192). 131-137.
- Reed, J. C., Miyashita, T., Takayama, S. Wang, H., Sato, T., Krajewski, S., Aimé-Sempé, C., Bdrug, S., Kitada, S., Hanada, M. 1996. BCL-2 Family Proteins: Regulators of Cell Death Involved in the Pathogenesis of Cancer and Resistant to Therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 1996 (60). 23-32.

- Sarkar, A., Das, J., Manna, P., Sil, P. C. 2011. Nano-copper Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Kidney via Both Extrinsic and Intrinsic Pathways. *Toxicology*. 2011 (290). 208-217.
- Shi, Y. 2004. Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell*. 2004 (117). 855-858.
- Shiozaki, E. N., Shi, Y. 2004. Caspases, IAPs and Smac/DiABOLO: Mechanisms from Structural Biology. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 39 (9). 487-494.
- Shizel, A., Kaufmann, T., Borner, C. 2004. Bcl-2 Family Members: Intracellular Targeting, Membrane-insertion, and Changes in Subcellular Localization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1644 (2-3). 95-105.
- Simmons, MJ., Fan, G., Zong, W., Degenhardt, K., White, E., Gélinas, C. 2008. Bfl-1/A1 Functions, Similar to Mcl-1, as a Selective tBid and Bak Antagonist. *Oncogene* 2008 (27). 1421-1428.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., Martin, S. J. 1999. Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *The Journal of Cell Biology*. 144 (3). 281-292.
- Sorenson, Ch. M. 2004. Bcl-2 Family Members and Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004 (1644). 169-177.
- Srinivasula, S. M., Ashwell, J. D. 2008. IAPs: What's in a Name? *Molecular Cell*. 2011 (30). 123-135.
- Stoka, V., Turk, V., Bredesen, D. E. 2006. Differential Regulation of the Intrinsic Pathway of Apoptosis in Brain and Liver During Ageing. *FEBS letters*. 2006 (580). 3739-3745.

- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J. C. 1998. IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspases Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Research*. 1998 (58). 5315-5320.
- Thorburn, A. 2004. Death Receptor- Induced Cell Killing. *Science Direct. Cellular Signalling*. 2004 (16). 139-144.
- Willis, S., Day, C. L., Hinds, M. G., Huang, D. C. S. 2003. The Bcl-2-regulated Apoptotic Pathway. *Journal of Cell Science*. 2003 (116). 4053-4056.
- Wuilléme-Toumi, S., Trichet, V., Gomez-Bougie, P., Gratas, C., Bataille, R., Amiot, M. 2007. Reciprocal Protection of Mcl-1 a Bim from Ubiquitin-proteasome Degradation. *Biochemical a Biophysical Research Communications*. 2007 (361). 865-869.
- Zhai, D., Jin, C., Huang, Z., Satterthwait, A. C., Reed, J. C. 2008. Differential Regulation of Bax and Bak by Anti-apoptotic Bcl-2 Family proteins Bcl-B and Mcl-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (15). 9580-9586.
- Zhai, D., Ke, N., Zhang, H., Lador, U., Joseph, M., Eichinger, A., Godzink, A., NG, S., Reed, J. C. 2003. Characterization of the Anti-apoptotic Mechanism of Bcl-B. *Biochemical Society* 2003 (376). 229-236.
- Ziegler, U., Groscurth, P. 2004. Morphological Features of Cell Death. *News Physiol Sci*. 2004 (19). 124-128.