

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů

Proteiny Bcl-2 rodiny a jejich funkce ve vnější mitochondriální membráně během apoptózy

Bakalářská práce

Lucie Markupová

V Praze 2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití dále uvedené literatury pod vedením školitelky Ivany Švandové.

V Praze:

Podpis:

ABSTRAKT

Apoptóza je formou programované buněčné smrti, je dějem zcela fyziologickým a je charakterizována specifickými morfologickými a biochemickými procesy. Na rozdíl od nekrózy, která postihne víceméně náhodnou buňku, je apoptóza indukována cíleně a buňka je usmrcena a následně odstraněna tak, aby nedošlo k poškození okolních buněk. Je to tedy děj organizovaný a přísně regulovaný. Velice významnou roli v procesu programované buněčné smrti hrají proteiny Bcl-2 rodiny. Tyto proteiny jsou schopny regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány, což je důležitý krok v celém procesu apoptózy. Proteiny Bcl-2 rodiny bývají obvykle rozděleny do tří skupin, dvě skupiny jsou pro-apoptotické a jedna skupina anti-apoptotická. Tzv. pro-apoptotické Bcl-2 proteiny obecně zvyšují propustnost vnější mitochondriální membrány. To vede k výlevu cytochromu c a jiných proteinů (SMAC/Diablo) z mitochondrie (signál pro provedení dalších kroků apoptózy). Tyto proteiny se pak účastní vzniku tzv. apoptosomu a aktivace vlastních výkonných proteinů apoptózy, kaspáz. Oproti tomu anti-apoptotické proteiny Bcl-2 rodiny deaktivují proteiny proapoptotické a zamezují jejich funkci.

Klíčová slova: apoptóza, Bcl-2 proteiny, mitochondrie, receptor smrti, kaspáza, cytochrom c

ABSTRACT

Apoptosis is a form of programmed cell death. It is physiological mechanism mediating catabolism of eucaryotic cells and is characterised by specific morphological and biochemical processes. It targets and destroys cells directly and afterwards eliminates cell without any damage to other nearby cells. Contrary of the apoptosis, necrosis affects more or less any random cell. Apoptosis is strictly organized and controlled process. A critical control point in apoptosis constitute proteins of the Bcl-2 family. These protein are able to adjust permeability of external (outer) mitochondrial membrane (OMM) which is an important step ahead of the whole process. Bcl-2 family proteins are usually divided into three groups. Two groups are pro-apoptotic and one group is anti-apoptotic. Pro-apoptotic Bcl-2 proteins are generally increasing permeability of outer mitochondrial membrane which leads to the release of cytochrome c and other proteins (SMAC/Diablo) from mitochondria. When cytochrome c is released frm mitochondria, it activates the assembly of the apoptosome in the cytosol that activated executive caspase. On the other hand, anti-apoptotic proteins deactivate pro-apoptotic proteins and regulate their function.

Key words: apoptosis, Bcl-2 proteins, mitochondria, death receptor, caspase, cytochrom c

Seznam zkratek

AIF	faktor indukující apoptózu (apoptosis inducing factor)
AKT	serin-threoninová kinasa
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
ATP, dATP	adenosintrifosfát, deoxyadenosintrifosfát
Bcl	lymfom B-buněk (B-cell lymphoma)
BH	Bcl-2 homologní (doména)
CARP	cardiac ankyrin repeat protein
CICD	na kaspázách nezávislé apoptotické dráhy (caspase-independent cell death)
cyt c	cytochrom c
DD	„doména smrti“ (death domain)
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
FADD	Fas associated death domain
Fas-L	Fas ligand
HDAC	histone deacetylase
HIAP-1	human inhibitor of apoptosis protein
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane)
INF- γ	interferon- γ
JNK	jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NESC	normal endometrial stromal cells
NIAP	neuronal inhibitor of apoptosis protein
NK	natural killer (cells)
OMM	vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane)
RIP	receptor-interacting protein
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SODD	silencer of death domain
TM	transmembránová doména (transmembrane domain)
TNF- α	tumor-nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor alpha)
TNFR	TNF receptor
TRADD	TNF-R-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
VDAC	voltage dependent anion channel
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

OBSAH

Abstrakt	3
Seznam zkratek	4
Obsah.....	5
ÚVOD	6
1. APOPTÓZA	7
1.1. Historie	7
1.2. Obecné znaky apoptózy	8
1.3. Nekróza vs. apoptóza	9
1.3.1 Nekróza	10
1.4. Apoptotické dráhy	11
1.4.1. Vnější signální dráha	11
1.4.2. Vnitřní signální cesta.....	13
1.4.3. Vzájemné propojení vnější a vnitřní signální dráhy.....	17
1.5. Regulace apoptózy	17
2. MITOCHONDRIE A APOPTÓZA	20
2.1. Obecná funkce a struktura mitochondrií.....	20
2.1.1. Struktura mitochondrií	20
2.1.2. Funkce mitochondrií	23
2.2. Mitochondrie v procesu apoptózy.....	25
3. PROTEINY Bcl-2 RODINY	26
3.1. Skupina I – Bcl-2 a Bcl-2 like antiapoptotické proteiny.....	28
3.1.1. Bcl-X	29
3.1.2. Bcl-2.....	29
3.1.3. Bcl-w	30
3.2. Skupina II. – BH123 proteiny.....	31
3.2.1. Bax	31
3.2.2. Bak a Bok.....	32
3.3. Skupina III. – BH3-only proteiny	33
3.3.1. Bid.....	33
3.3.2. Bim.....	34
3.3.3. Bmf.....	34
3.3.4. Bad a Bik.....	34
3.3.5. Puma a Noxa	34
ZÁVĚR.....	35
SEZNAM LITERATURY	36

ÚVOD

Programovaná buněčná smrt - apoptóza je děj charakterizovaný specifickými morfológickými a biochemickými procesy. Je to děj zcela fyziologický, pomocí něhož jsou z organismu odstraňovány buňky poškozené, nepotřebné a nadbytečné. Apoptóza hraje důležitou roli nejen v organogenezi, ale je to i jeden ze způsobů udržení tkáňové homeostázy organismu.

Jedněmi z prvních, kdo popsali proces apoptózy, byli Kerr, Curie a Wyllie v 70. letech 20. století. Daný děj označili jako „programmed cell necrosis“, aby odlišili pozorovaný proces od nekrózy jako takové (Kerr a kol., 1972). Programovaná buněčná smrt byla však zkoumána daleko dříve. Již roku 1842 ji označil německý biolog Carl Ch. Vogt jako způsob odstranění nepotřebných buněk během ontogeneze (http://en.wikipedia.org/wiki/Carl_Vogt). Biolog C. Vogt konkrétně využil modelu žabích pulců, kterým odumírají očasní buňky při přeměně v dospělce. K velkému rozmachu studia programované buněčné smrti došlo v 80. letech 20. století. V roce 2002 byla dokonce za výzkum v oblasti genetické regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti udělena Nobelova cena za fyziologii.

Poruchy apoptózy mohou za patologických podmínek zapříčinit vznik mnoha onemocnění. Nefyziologické odchylky v programu řízené buněčné smrti mohou například způsobit vznik neurodegenerativních onemocnění jako jsou Parkinsonova či Alzheimerova choroba. Porucha procesu apoptózy může také indukovat vznik aplastické anémie s těžkou aplázií kostní dřeně a útlumem krvetvorby, aterosklerózy nebo myelodysplastického syndromu. Patologická apoptóza je také odpovědná za vznik maligních onemocnění, např. melanomu, karcinomu prsu, prostaty či rakoviny plic (Holcik a kol., 2005).

Velice významnou roli v regulaci apoptózy hrají proteiny Bcl-2 rodiny. Název rodiny je odvozen od Bcl-2 proteinu, původně popsaného v B-buňkách maligního lymfomu - proto je také označován jako Bcl protein (Tsujimoto a kol., 1985). Tyto proteiny jsou schopny regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány pro některé proteiny (cytochrom c aj.), což je zásadní krok v celém procesu apoptózy.

Tato práce se pokouší přiblížit některé proteiny Bcl-2 rodiny, které během apoptózy s vnější mitochondriální membránou přímo interagují a/nebo funkci proteinů přímo interagujících s vnější mitochondriální membránou ovlivňují.

1. APOPTÓZA

Apoptóza je proces programované buněčné smrti, též nazývaný „buněčná sebevražda“. Je to děj geneticky kódovaný a fylogeneticky značně konzervativní. Apoptóza je indukována cíleně a buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Je to organizovaný a přísně regulovaný děj. Buněčná smrt je fyziologický proces, který je nezbytný pro správný embryonální vývoj a pro zachování tkáňové homeostázy. Apoptóza je důležitá např. pro odstranění buněk infikovaných virem a buněk, u kterých došlo k poškození DNA.

1.1. HISTORIE

Slovo „apoptosis“ pochází z řečtiny. Pro označení programované buněčné smrti jej navrhl profesor James Cormack z katedry řečtiny na aberdeenském univerzitě. Původní řecký pojem byl určen opadávání okvětních plátků květů či listů ze stromů. Následně se mu tedy znovu vrátilo jeho medicínské užití, i když v poněkud jiném významu než před dvěma tisíciletími v Řecku – Hippokrates používal termín apoptosis pro „opadávání masa z kostí“. Později jej Galén rozšířil i na opadávání strupů a strupovitých útvarů obecně. K použití termínu „apoptosis“ prof. Cormacka jej možná inspiroval Kerr a kolegy popisovaný vznik „puchýřků“ na povrchu apoptické buňky. Kerr, Curie a Wyllie v 70. letech 20. století původně použili termín „programmed cell necrosis“, kterým chtěli označit jinou formu buněčné smrti a vymezit ji oproti nekróze. Poměrně záhy však ve svých publikacích začali používat pojmenování apoptosis. Apoptózu popsali jako: „... mechanismus kontrolované buněčné smrti, který hraje komplementární, avšak opačnou roli ve vztahu k mitóze v regulaci buněčných populací živočichů“ (Kerr a kol., 1972; Meijerink a kol., 1998; Alberts a kol., 2002).

Apoptóza byla ale pozorována již mnohem dříve. Roku 1842 popsal poprvé německý biolog C. Ch. Vogt (http://en.wikipedia.org/wiki/Carl_Vogt) apoptózu během vývoje pulců ropušky starostlivé (*Alytes obstetricians*). Na tomto modelovém příkladu přeměny pulce v žábu popsal předem danou smrt buněk, kdy buňky ocasu v procesu ontogeneze odumrou, takže u žab, které ho nepotřebují, se již nevyskytuje (Alberts a kol., 2002). Přibližně v 80. letech 19. století popsali Veigert a Conheim zvláštní variantu nekrózy, pro niž byl typický velmi pomalý rozpadem buněk. Je velmi pravděpodobné, že již v těchto případech šlo také o jedna z prvních pozorování apoptického zániku buněk (Nečas, 2000). Rozsáhle se studiu apoptózy věnovala a věnuje zejména embryologie (např. Glucksmann, 1951).

V roce 1965 Kerr prokázal, že podvaz portální žíly u krys vede k involuci buněk periportálního parenchymu. Po těchto buňkách zůstalo mikroskopicky pozorovatelné množství malých kulatých vezikul, ale bez dalších znaků zánětlivé reakce, která je obvyklá při nekróze. Podrobným

studiem tohoto jevu prokázal, že tato tělíska obsahovala intaktní organely, chromatin a jaderné zbytky. Pro popis tohoto jevu nejprve užil název „shrinkage necrosis“. Až o několik let později jej nahradil pojmem „apoptosis“ (Nečas, 2000; Kumar a kol., 2005).

Wyllie postuloval roku 1987 dva základní axiomy, které se týkají apoptózy po účinku toxických látek:

- 1) apoptóza je navozena škodlivými stimuly menší síly, než jaké vedou u stejných buněk k nekróze;
- 2) je ji snadnější vyvolat v těch tkáních, které za fyziologických podmínek prodělávají rychlou obměnu buněčné populace (Wyllie, 1987).

V 80. letech 20. století došlo k intenzivnímu studiu apoptózy, zejména v oblasti morfologické, biochemické a cytogenetické. Bylo mj. potvrzeno, že apoptóza je děj spojený se štěpením DNA na mnohočetné fragmenty (Kumar a kol., 2005) a byla objasněna spojitost mezi štěpením DNA při apoptóze a indukcí endonukleázy za přítomnosti kalciových iontů (Gaido a Cidlowski, 1991). Sydney Brenner, H. Robert Horvitz a John E. Sulston v roce 2002 obrželi Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za výzkum v oblasti genetické regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti.

1.2. OBECNÉ ZNAKY APOPTÓZY

Programovaná buněčná smrt je fyziologický proces, který je nezbytný pro správný embryonální vývoj a pro zachování tkáňové homeostázy. Apoptóza je důležitá např. pro odstranění buněk infikovaných virem a buněk, u kterých došlo k poškození DNA. Významně uplatňuje v prenatálním vývoji jedince, kdy celé skupiny buněk hynou apoptózou během vývoje tkání a orgánových soustav (například rozestup tkání během vývoje prstů či vývoje tělních dutin). Postnatálně potom dochází například k selekci dozrávajících T lymfocytů v brzlíku, kde jsou autoreaktivní klony T lymfocytů (buňky reagující imunitní odpovědí proti buňkám vlastního těla) eliminovány apoptózou. Stejně tak hynou i klony, které naopak reakce s antigenem nejsou schopny vůbec. V postnatálním období je rovněž apoptoticky podmíněna i přestavba fetální cirkulace nebo fyziologickou obnovou některých epitelů, např. enterocytů či endometria (Kerr a kol., 1972; Jin a El-Deiry, 2005).

Apoptóza může být indukována buď signálem zvenčí, nebo přímo z buňky samotné. Vnějšími zásahy, které iniciují proces buněčné smrti jsou např. ionizující záření, hypertermie, působení toxických látek, steroidních hormonů, cytokinů, NO, virovými infekcemi či imunitními pochody. Vnější indukci může být například akce cytotoxického (CD8+) T lymfocytu, který se na buňku z určitého důvodu zaměří, např. nádorové a virem infikované buňky. Dalším spouštěčem může být naopak absence jakéhokoli signálu. Buňka bez kontaktu s ostatními buňkami a bez stimulace určitými cytokiny tak může také podlehnout apoptotickému procesu (Kashiwagi a kol., 1999; Saikumar a kol.,

1999). Důvodem pro zahájení apoptózy z vnitřního podnětu pak může být například takové poškození jaderné DNA, které není buňka schopna opravit svými reparačními mechanismy. Apoptóza může být indukována též ztrátou ukotvení buněk k extracelulární matrix. Pro tento pochod se používá termín „anoikis“, odvozený z řeckého výrazu pro „bezdomovectví“. Anoikis má význam zejména pro apoptózu epitelových buněk (Kirkin a kol., 2004; Liotta a Kohn, 2004).

Mezi charakteristické znaky apoptózy patří zmenšení buňky, kondenzace chromatinu, fragmentace DNA a utváření apoptotických tělísek. Apoptotická fragmentace DNA je charakteristická tím, že jí vždy předchází změny morfologické. Fragmentace DNA je způsobena štěpením dvouvláknové molekuly DNA v internukleozomálních oblastech na dvouvláknové fragmenty. Fragmenty o délce přibližně 185 párů bází jsou poté pohlceny fagocyty. Štěpení je zajištěno specifickou endonukleázou CAD (caspase activated DNase) (Gaido a Cidlowski, 1991).

Vlastní průběh apoptózy využívá buněčné enzymatické regulační kaskády. Uplatňují se zde zejména tzv. kaspázy, neboli cystein aspartate specific proteases (Jiang a Wang, 2004; Jin a El-Deiry, 2005). Tyto proteiny se v buňce nacházejí v neaktivním stavu jako tzv. pro-kaspázy. Jejich aktivace proapoptotickým signálem vede k dějům, kterými se buňka připravuje na svou smrt. Dochází k fragmentaci jaderné DNA, na rozdíl od nekrózy je však fragmentace nenáhodná a fragmenty jsou stejně dlouhé. Buňka se také trochu smrští a změní se i charakter různých organel, významnou úlohu v apoptóze hrají mitochondrie. Celý proces končí rozpadem buňky do tzv. apoptotických tělísek, což jsou membránou ohraničené buněčné fragmenty, které jsou následně fagocytovány makrofágy. Důležitým aspektem apoptózy a významným rozdílem odlišujícím proces apoptózy a nekrózy je fakt, že nitrobuněčné enzymy nepoškodí okolní buňky (Holcik a kol., 2005; Jin a El-Deiry, 2005).

Apoptóza je zcela fyziologickým dějem. Na rozdíl od nekrózy, která postihne víceméně náhodnou buňku, která byla vystavena příliš intenzivním nepříznivým vlivům, je apoptóza indukována naprosto cíleně a buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Je to tedy organizovaný a přísně regulovaný děj.

1.3. NEKRÓZA VS. APOPTÓZA

Náhodné zničení buňky, známé jako nekróza, je za normálních okolností nežádoucí. Ke smrti buňky nekrozou dojde v případě, že je buňka vážně poškozena fyzikálním či chemickým způsobem. Při nekróze buňky většinou otékají a rozpadají se, přičemž vypouštějí cytoplazmatický materiál, který vyvolá zánětlivou odpověď v mezibuněčné hmotě. Hlavním rozdílem mezi nekrozou a apoptózou je fakt, že při nekrotické smrti je buňka pasivní obětí, avšak u apoptózy je buňka aktivním účastníkem. Dokonce vynakládá vlastní energii na to, aby dosáhla vlastního zániku. Zda buňka zemře apoptózou

či nektrózou závisí zčásti na faktorech zahrnujících signální specifika smrti buňky, fyziologické prostředí, stav tkáně a stadium vývoje buňky.

Mitochondrie hrají důležitou a ústřední roli ve zprostředkovávání vnitřního apoptózy vnitřní signální drahou. U nekrotické smrti jsou mitochondrie a další buněčné organely prvními, které nabobtnají a vylijí se ven z buňky. Tento proces je následován rozkladem celé buňky. U apoptózy se buňka namísto otoku smršťuje působením vnitřních mechanismů. Tím, že se daná buňka smršťuje, odtahuje se od buněk okolních. Výsledkem je, že apoptotická buňka v normálním případě nespustí zánětlivou odpověď.

1.3.1 Nekróza

Nekróza je oproti apoptóze vždy procesem patologickým. U buněk může být vyvolána různými vlivy, ať už se jedná o působení mechanické, chemické či tepelné. Nekrózu může vyvolat také virová infekce buňky, různé bakteriální toxiny nebo třeba i náhlé vyčerpání buněčných energetických zásob - například vlivem ischemie (Ganong, 2005; Holcik a kol., 2005).

Podstatným znakem je, že při nektróze dochází k neregulovanému poškození integrity cytoplazmatické membrány, což vede k narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky. Dochází k objemovým změnám – edému, ať už celé buňky nebo některých organel (mitochondrií, endoplazmatického retikula). Proces nakonec vrcholí enzymatickým poškozením buňky a jejím rozpadem. Kompletní obsah buňky se uvolní do okolí, přičemž enzymy takto uvolněné mohou indukovat nektrózu dalších okolních buněk, čímž způsobí "řetězovou reakci", při které dojde k rozsáhlejšímu poškození tkáně a následné zánětlivé reakci. Zánětlivá reakce vyvolaná nektrózou ovšem může potenciálně stimulovat imunitní odpověď organismu a tak zvyšovat počet usmrčených nádorových buněk (Vande Velde a kol., 2000). Souhrnný přehled rozdílů mezi apoptózou a nektrózou podávají tabulky 1a a 1b.

Tab. 1a: Charakteristické znaky apoptózy.

<i>Apoptóza</i>	cytologické charakteristiky
děj fyziologický i patologický	smršťování buňky
aktivní proces vyžadující energii	kondenzace a hrudkování chromatinu jádra
geneticky řízená	vznik póru v mitochondriální membráně za účasti Bcl-2 proteinů
síla působících negativních stimulů menší	fragmentace DNA na pravidelné úseky
nástup je pomalý /hodiny/	vznik tzv. apoptotických tělísek, která jsou pohlcena fagocyty
odstranění apoptotických buněk je rychlé a diskrétní	dochází k acidifikaci cytoplasmu a aktivaci kaspas

Tab. 1b: Charakteristické znaky nekrózy.

<i>Nekróza</i>	cytologické charakteristiky
děj vždy patologický	zvětšení objemu buňky
pasivní proces nevyžadující ATP	aktivace enzymů vedoucí k poruše buněčných membrán
je výsledkem neschopnosti buňky udržet svou strukturálně-funkční integritu	desintegrace mitochondrií
síla působících negativních stimulů větší /vždy intenzivní podnět/	náhodný lytický rozklad chromatinu DNA
nástup je rychlý /minuty, vteřiny/, odstranění nekrotických buněk je pomalé	totální lýza buňky vedoucí k zánětlivé reakci okolí pH buňky se nemění, bez aktivace kaspas

1.4. APOPTOTICKÉ DRÁHY

Proces apoptózy podléhá velmi složitým regulačním mechanismům, je geneticky řízen na několika úrovních, mnoha geny, které kódují mnoho cytoplazmatických a membránových proteinů. Apoptotický děj probíhá v několika fázích. Vždy je zahajován tzv. iniciační (signální) fází. V tomto okamžiku lze ještě apoptózu zastavit, jedná se tedy o část reverzibilní. Apoptóza může být aktivována dvěma hlavními způsoby (Jin a El-Deiry, 2005):

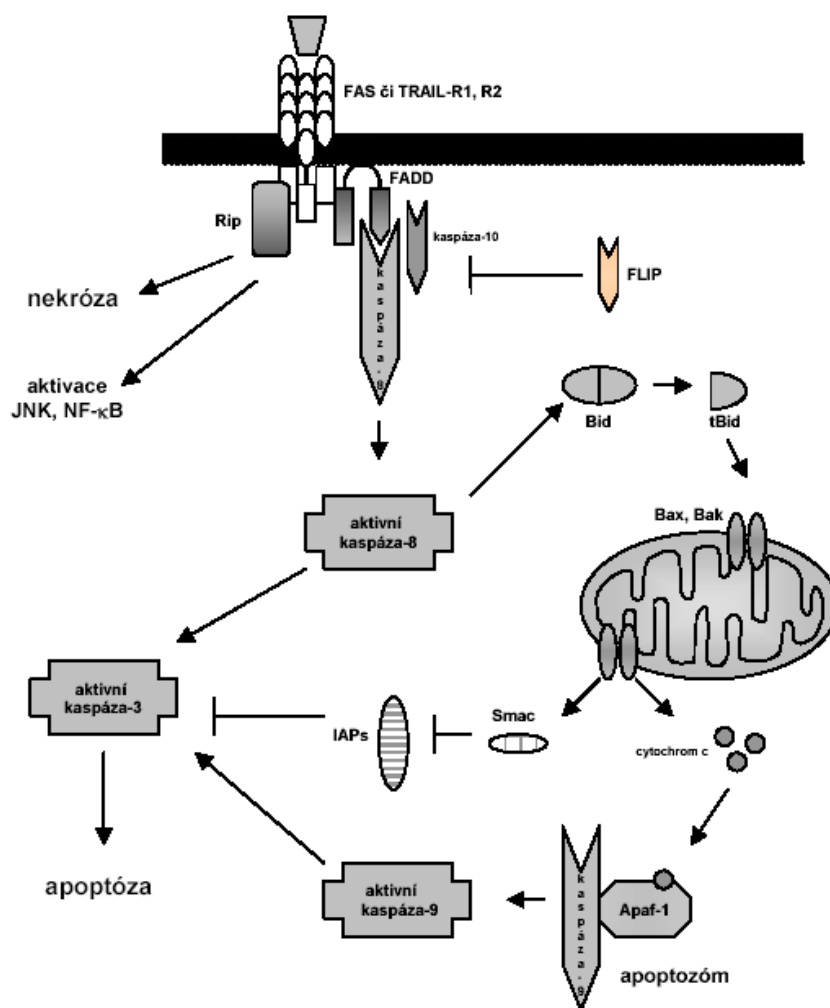
1. Vnější cestou, tj. stimulací specifických receptorů smrti (DR-Death Receptor) na povrchu buňky a uvolněním či aktivací některých specifických proteinů (Bax, Bim, Bid, Bad, DISC - buněčnou smrt navozující signalizující komplex, Death Inducing Signalling Complex).
2. Vnitřní cestou, v níž centrální roli hrají protein p53 a mitochondrie.

1.4.1. Vnější signální dráha

Vnější signální cesta (obr. 1) začíná aktivací receptorů v membráně buňky. Tyto receptory bývají také označovány jako receptory smrti a jejich ligandy hrají zásadní úlohu v iniciaci apoptózy. Patří do rodiny receptorů pro TNF (tumor nekrotizující faktor). Mezi hlavní zástupce „receptorů smrti“ patří TNF receptory, Fas receptory či TRAIL receptory. Mají funkci senzorů, které po obdržení extracelulárního signálu (prostřednictvím navázání svých ligandů) vedou k rychlé iniciaci apoptózy v buňce. Signální dráhy jednotlivých receptorů se v určitých aspektech liší, stejně jako míra jejich zastoupení ve fyziologické regulaci apoptózy, nicméně jednotlivé prvky lze vysledovat u všech tří receptorových typů. Obsazení receptoru smrti jeho ligandem vede k oligomerizaci receptorů

v membráně a aktivaci jejich specifických cytoplasmatických domén. Ty reagují s adaptorovými proteiny obsahujícími tzv. doménu smrti (DD - Death Domain), jako jsou FADD, TRADD či Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1. Spojení několika receptorů s adaptorovými proteiny indukuje agregaci proteinů prokaspáz (zejména prokaspázy-8) a vznik komplexu DISC. Tento komplex byl prvně popsán v apoptotické signální dráze Fas receptorů. Dimerizace prokaspáz v komplexu DISC vede k jejich autoaktivaci. Aktivované kaspázy se uvolňují z komplexu DISC do cytoplasmy ve formě heterotetrameru. Působením aktivovaných kaspáz následně dochází k aktivaci vlastních efektorových kaspáz apoptózy a spuštění kaspázové kaskády (Hsu a kol., 1995; Wang a kol., 1996a; Wang a kol., 1998; Micheau a kol., 2002; Wajant, 2003; Wajant a kol., 2003; Jin a El-Deiry, 2005). Cílem vnější cesty je aktivace prokaspázy-8 a pro-kaspázy-10 (viz obr.1).

V buňce se rovněž vyskytují bílkoviny tzv. klamající receptory, neboli návnady (decoy receptors), které jsou analogy receptorů smrti, ale navázání ligandu nevede k přenosu signálu do nitra buňky. Zatím byly popsány decoy receptor DcR3 pro Fas ligand a tři decoy receptory pro TRAIL, receptory DcR1, DcR2 a OPG. Tyto receptory nemají funkční tzv. doménu smrti (Kvasnicka a Petrasek, 1995; Jin a El-Deiry, 2005).



Obr. 1. Zjednodušené schéma vnější signální apoptotické dráhy. Cesta začíná přes tzv. receptory smrti a končí aktivací vlastních výkonných enzymů kaspáz. Čáry zakončené plnou šipkou představují pozitivní interakce jednotlivých členů apoptotické kaskády, čáry zakončené kolmicí interakce negativní. Bližší podrobnosti viz text. Převzato z Drvorská a kol., 2008.

1.4.2. Vnitřní signální cesta

Vnitřní signální cesta (obr. 2) je v zásadě aktivována dvěma způsoby: permeabilizací vnější mitochondriální membrány navozenou různými událostmi nebo přímým poškozením jaderné DNA vlivem různých metabolitů, toxinů, volných radikálů a jiných mutagenních sloučenin. V případě poškození DNA a spuštění apoptózy hraje klíčovou roli gen p53 a jím kódovaný stejnojmenný protein, v případě mitochondriální vnitřní signální dráhy je dominantní událostí uvolnění cytochromu c do cytoplasmy a spuštění řady následných kroků (Jin a El-Deiry, 2005).

Tumor supresorový protein p53 (označovaný jako „molekula roku 1993“ zvolená časopisem Science nebo též „strážce genomu“) je transkripční faktor, který působí třemi hlavními antikancerogenními mechanismy: (i) může aktivovat proteiny opravující DNA, je-li tato poškozena;

(ii) je schopen zadržet buňku v určité fázi růstového cyklu a tím prodloužit období, během kterého může být DNA opravena nebo je (iii) schopen aktivovat apoptózu či zrychlenou buněčnou senescenci a tím iniciovat odklizení nereparabilní buňky. p53 je aktivován poškozením DNA a slouží jako posel k iniciaci apoptózy. U některých jednobuněčných organismů, např. u kvasinek, tento protein neexistuje (Muller a kol., 1998). Hlavní funkcí p53 je rozpoznat genetické poškození, iniciovat a katalyzovat jeho opravu. Léze DNA (především dvojité zlomy) vedou ke vzniku řady proteinů aktivujících p53. Výsledkem aktivace této dráhy je inhibice buněčného cyklu v G₁/S fázi do doby, než je poškození opraveno (Taskin a kol., 1997). Pokud protein p53 odhalí změnu DNA přesahující možnost reparace, zvýší se jeho exprese a indukuje syntézu dalších proteinů, které poškozují mitochondrie. Indukuje tvorbu proteinů Puma a Noxa, které zprostředkovávají odpověď buňky na genotoxické poškození. Protein p53 transkripčně dále reguluje např. geny pro Bax, Apaf-1, Fas, killer/DR5 receptory nebo protein pidd (Le a kol., 1999; Soda a kol., 1999).

Stejně jako vnější, i vnitřní signalizační apoptické dráhy jsou primárně iniciovány vně buněk. Centrálním regulačním místem vnitřní signalizační apoptické dráhy se ovšem zdají být mitochondrie. Z hlediska apoptózy je pak klíčovou událostí permeabilizace vnitřní mitochondriální membrány navozená a kontrolovaná zejména proteiny tzv. Bcl-2 rodiny (Reed, 1994; Reed a kol., 1996; Jin a El-Deiry, 2005).

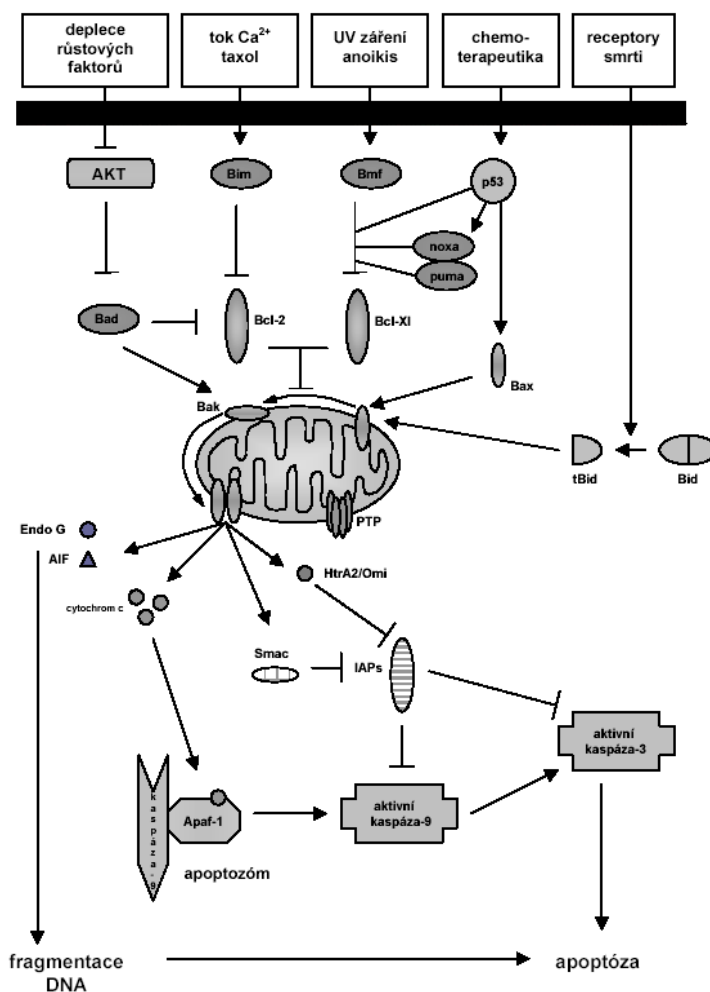
Pokud převáží exprese tzv. BH123 proteinů z Bcl-2 rodiny, jako jsou proteiny Bak či Bax, dochází k ireverzibilnímu spuštění apoptózy. Již předtím aktivované pro-apoptotické tzv. BH3-only proteiny následně navodí oligomerizaci BH123 proteinů (Bak, Bax) a jejich inserci do vnitřní mitochondriální membrány. Bax/Bak poté vnější mitochondriální membránu permeabilizují, což v důsledku vede k vylití dalších apoptogenních proteinů, otevření velkých iontových kanálů ve vnitřní mitochondriální membráně (PTP, permeability transition pore complex) i membráně vnější, dochází ke vtoku vody a ztrátě iontové nerovnováhy na mitochondriální membráně. Mitochondrie bobtná, ztrácí svůj membránový potenciál ($\Delta\Psi_m$), vnější mitochondriální membrána praská a dochází k uvolnění matrix do cytoplasmy buňky. Celý tento proces vede k smrti buňky jednak díky uvolnění mitochondriálních proteinů do cytoplasmy, což spouští další děje, a jednak díky ztrátě základní úlohy mitochondrie, tedy produkce ATP v dýchacím řetězci (Jin a El-Deiry, 2005).

Mezi proteiny uvolněnými do cytoplasmy je i cytochrom c. Cytochrom c se váže na protein Apaf-1 a za přítomnosti ATP/dATP vzniká komplex známý jako apoptozóm. Apaf-1 je adaptorová molekula vážící prokaspázu-9. Oligomerizací aktivovaná prokaspáza-9 posléze už jako kaspáza-9 aktivuje další, v rámci apoptotické kaskády konečné výkonné kaspázy (kaspázu-3, -6 a -7) (LaCasse a kol., 1998).

Druhou důležitou skupinou proteinů uvolněných do cytoplasmy z mitochondriální matrix jsou tzv. IAP antagonisté. IAP proteiny jsou inhibitory apoptózy. Jde o anti-apoptotické proteiny zastavující apoptózu inhibicí aktivovaných kaspáz. IAP antagonisté jsou uvolňovány z prasklých

mitochondrií, váží se na IAP proteiny, obsazují tak vazebná místa pro kaspázy a tím IAP proteiny inaktivují, neboť k vazbě aktivovaných kaspáz už nemůže dojít. Mezi hlavní IAP antagonisty stimulující apoptózu patří proteiny Smac (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO, HtrA2/Omi a GSPT₁/eRF₃ (viz obr. 1).

Současně se zvyšuje tvorba volných kyslíkových radikálů, které zbylé mitochondrie dále poškozují (Holcik a kol., 2005).



Obr. 2. Zjednodušené schéma vnitřní signální apoptotické dráhy. Apoptotické stimuly ovlivňují mitochondrie bez zprostředkování signalizace receptory smrti. Čáry zakončené plnou šipkou představují pozitivní interakce jednotlivých členů apoptotické kaskády, čáry zakončené kolmicí interakce negativní. Bližší podrobnosti viz text. Převzato z Dvorská a kol., 2008.

Signální fáze apoptózy je ukončena aktivací proteinů nazývaných **kaspázy** (caspases – cystein-requiring aspartate proteases) zodpovědných za proteolytickou degradaci intracelulárních proteinů. Jde o skupinu cysteinových proteáz hydrolyzujících proteiny speciálně v místě aspartátu. Kaspázy mají klíčový význam v celém procesu programované buněčné smrti a jejich aktivace zahajuje ireversibilní, neboli rozkladovou fázi apoptózy („point of no return“).

V současnosti je známo 14 lidských isoform těchto enzymů, které lze podle jejich funkce zhruba rozdělit do tří hlavních skupin (Jin a El-Deiry, 2005; Abe a kol., 2006).

- (i) Kaspázy účastníci se zánětlivé reakce, nikoliv apoptózy. Tato skupina zahrnuje kaspázy -1, -4, -5, -11, -12, -13 a -14.
- (ii) Iniciační kaspázy apoptické kaskády. Tato skupina zahrnuje kaspázy obsahující buď efektorovou doménu smrti DED (kaspázy-8 a -10) nebo tzv. doménu CARD, která slouží ke zprostředkování interakce kaspáz s různými adaptorovými molekulami (kaspázy-2 a -9).
- (iii) Efektorové (výkonné) kaspázy apoptické kaskády (kaspázy-3, -6 a -7) jsou typicky aktivovány iniciačními kaspázami a během postupující apoptózy štěpí různé buněčné substráty.

Kaspázy jsou syntetizovány ve formě neaktivních molekul, tzv. prokaspáz, které se pro výkon své funkce musí aktivovat výše uvedeným signálním procesem. Obě signální dráhy směřují aktivaci svých prokaspáz (kaspázy-8 a -10 vnější signální cestou a kaspázy-9 vnitřní signální cestou) ke spuštění proteolytické aktivity výsledných efektorů, jimiž jsou kaspáza-3, -6 a -7. Aktivace kaspázy -3 má pro buňku smrtící důsledky. Kaspázy inhibují reparační mechanismy DNA, působí proteolýzu bílkovin skeletu buňky, proteinů membrán, destruuji cytoskeletální struktury a vedou k aktivaci endonukleáz (CAD - caspase activated DNase). Účinkem endonukleáz dochází k fragmentaci jaderné DNA. Jde o ireverzibilní událost, která odsoudí buňku ke smrti. Bylo dokázáno, že tato fragmentace je následkem aktivace endogenní Ca^{2+} a Mg^{2+} dependentní jaderné endonukleázy. Tento enzym selektivně štěpí DNA, vznikají tak mono- a oligonukleozómové fragmenty DNA (Gaido a Cidlowski, 1991). Důležitým cílem kaspáz je jedna z podjednotek DNA fragmentačního faktoru (DNA fragmentation factor 45 kDa subunit, DFF45/ICAD), která hraje zásadní roli v intranukleosomální degradaci DNA během apoptózy. Významnou skupinou proteinů napadaných kaspázami jsou proteiny podílející se na opravách poškozené DNA, jako je např. poly(ADP-ribose)polymerasa (PARP) (Shimizu a kol., 2004; Staibano a kol., 2005; Brustmann, 2007). Kaspázy štěpí také některé proteiny respiračního řetězce, což vede k charakteristickým mitochondriálním změnám spojeným s apoptózou (ztráta transmembránového potenciálu aj.). Kaspázy atakují i proteiny regulující buněčný cyklus, např. inhibiční faktory jako Cdc27, Wee1 nebo některé Cdk inhibitory. Mezi strukturální proteiny štěpené kaspázami patří např. fodrin či gelsolin, jejichž proteolýza vede k rozpadu sítě aktinových filament. Mezi další kaspázami atakované proteiny buněčného skeletu patří např. keratiny 18 a 19 či vimentin. Štěpení jaderných laminů vede ke smršťování jádra. Rozklad proteinů zodpovědných za vzájemnou adhezi buněk v tkáni, jako jsou β - nebo γ -catenin, vede ke ztrátě buněčných interakcí, což dále oslabuje schopnost buněk přežít. Kaspázy rovněž štěpením likvidují i některé anti-apoptické proteiny jako Bcl-2, Bcl-XL, IAPs nebo FLIP_L. Jiné pro-apoptické naopak štěpením aktivují a apoptotický signál tak zesilují (např. protein Bid) (Jin a El-Deiry, 2005).

1.4.3. Vzájemné propojení vnější a vnitřní signální dráhy

Spuštění apoptózy vyžaduje v některých buňkách aktivaci obou signálních drah, vnější i vnitřní, zároveň. S přihlédnutím k nutnosti spuštění jen jedné či obou signálních cest můžeme buňky rozdělit do dvou tříd: na buňky I. typu, kterým k plnému spuštění apoptózy stačí aktivace kaspázy-8 v komplexu DISC, a na buňky II. typu, jež ke spuštění apoptózy potřebují i signály z vnitřní mitochondriální dráhy, neboť jejich DISC komplexy obsahují ke spuštění apoptózy nedostatečné množství FADD a kaspázy-8 (Gross a kol., 1999; Jin a El-Deiry, 2005). Množství kaspázy-8 je nicméně dostatečné na to, aby dokázala štěpit jeden z proapoptotických proteinů z rodiny Bcl-2, a to cytosolický protein Bid. Kaspázou-8 rozštěpený Bid putuje jako tBid k mitochondrii, kde po inserci do mitochondriální membrány spouští procesy vedoucí k mitochondriální dysfunkci, uvolnění cytochromu c a dalších molekul do cytoplasmy a spuštění cesty mitochondriální smrti (Wang a kol. 1996b; Yin a kol., 1999).

Dalšími molekulami, propojujícími vnější a vnitřní apoptotickou signální dráhu, jsou proteiny uvolňované po permeabilizaci mitochondriální membrány. Typickým příkladem je protein Smac/DIABLO, uvolňovaný z mitochondrií při apoptóze navozené signalizací přes receptory smrti. Tento protein interaguje s jedním z inhibičních proteinů apoptózy, proteinem XIAP, a sekvstruje jej. XIAP následně nemůže inhibovat kaspázy-3 a -9, které tak podstoupí svou plnou proteolytickou aktivaci. Kaspáza-3 pak kromě dalších proteinů štěpí i XIAP, čímž usnadňuje apoptotickou zpětnou vazbu a celý systém funguje jako amplifikační smyčka ústící v nevratné spuštění apoptózy (Jin a El-Deiry, 2005).

Obě signální dráhy propojuje zřejmě i kaspáza-8. Tato kaspáza se sice dominantní signalizační kaspáza vnější dráhy, ale může být regulována i vlastním „výkonným“ enzymem apoptózy, kaspázou-6. Podle *in vivo* studií může být kaspáza-6 hlavním aktivátorem kaspázy-8, neboť inhibice této kaspázy výrazně snížila aktivitu kaspázy-8 a ovlivnila celkové nastartování apoptózy (Cowling a Downward, 2002).

Propojení mezi vnější a vnitřní signální dráhou lze najít nejen na úrovni aktivace efektorových kaspáz, ale i v regulaci počátečních prvků signální dráhy. Typickým příkladem může být vícečetná funkce proteinu p53. Jako odpověď na poškození DNA, působí p53 nejen na vnitřní pro-apoptotické molekuly jako Bax či Puma, čímž aktivuje mitochondriální signalizační dráhu. p53 také upreguluje geny proteinů účastnících se vnější signální kaskády, např. geny pro FasL či killer/DR5 receptor smrti (Taskiran a kol., 1997; Le a kol., 1999).

1.5. REGULACE APOPTÓZY

Apoptotická kaskáda je velmi přísně regulována. V jejím průběhu existují body, ve kterých se mohou uplatnit různé kontrolní mechanismy. Mezi tyto mechanismy patří např. in/aktivace různých

enzymů či míra exprese různých pro- a antiapoptotických proteinů. Právě vzájemný poměr hladin pro- a protiapoptotických složek pak předurčuje definitivní osud buňky - viz obr. 3.

Ve spuštění či zastavení apoptózy hrají zásadní roli proteiny tzv. Bcl-2 rodiny, která zahrnuje zástupce pro- i antiapoptotické. Antiapoptotický protein Bcl-2 byl primárně nalezen v B-buňkách maligního lymfomu (**B-cell lymphoma**), odtud tedy pramení i jeho označení. Tato proteinová rodina zahrnuje asi 20 zástupců, kteří obsahují alespoň jednu ze čtyřech evolučně konzervovaných BH-domén. Anti-apoptotickými členy této rodiny jsou vlastní protein Bcl-2 a jemu strukturně velmi příbuzné proteiny Bcl-X1, Bcl-w, A1 a Mcl-1. Mezi pro-apoptotické proteiny řadíme Bax, Bak, Bok, které obsahují tři z BH-domén (tzv. BH123 proteiny), a proteiny obsahující pouze jednu BH-doménu, jako jsou Bid, Bad a Bim (tzv. BH3-only proteiny) (Petros a kol., 2004; Danial, 2007). Anti-apoptotické proteiny mohou zabránit buněčné smrti vyvázáním (sekvestrací) či neutralizací BH123 proteinů: v jejich struktuře najdeme tzv. hydrofobní „kapsičku“, která naváže BH3-doménu pro-apoptotických proteinů, a tím je inaktivuje. Bax vytváří s Bcl-2 heterodimer s antiapoptotickým účinkem (Kuwana a kol., 2005). Při zvýšené expresi Bax však vznikají homodimery Bax/Bax, které naopak apoptózu usnadňují. Právě poměr Bcl-2 a Bax, někdy nazývaný „Bcl-2/Bax reostat“ je kontrolním bodem, po jehož překročení je proces apoptózy již ireversibilní - viz obr. 3 (Clarke a Tyler, 2009).

Nástup buněčné smrti mohou blokovat i tzv. inhibitory apoptózy (IAPs). IAPs jsou malé proteiny blokuující nástup apoptózy ještě před zahájením rozkladové fáze (LaCasse a kol., 1998). Činí tak tím, že zabraňují aktivaci prokaspáz. V lidském materiálu bylo zatím popsáno osm těchto proteinů, z nichž nejlépe charakterizovaným a inhibičně nejsilnějším se zatím ukázal protein XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein). Další zástupci IAPs jsou: HIAP-1 (Human inhibitor of apoptosis protein), HIAP-2, NIAP (Neuronal inhibitor of apoptosis protein), c-IAP1, cIAP2, survivin a livin. Tyto proteiny blokují apoptózu přímou vazbou a inhibicí některých kaspáz (Yang a Li, 2000). Zvýšená exprese survivinu byla opakovaně potvrzena u mnoha typů nádorů (prs, střeva, prostata, melanom, neuroblastom, non-Hodgkinský lymfom, močový měchýř aj.). Byla také prokázána pozitivní souvislost s expresí těchto proteinů a progresí onemocnění (LaCasse a kol., 1998).

Apoptózu inhibičně ovlivňují i tzv. CARP proteiny. Tyto apoptotické inhibitory se váží na kaspázy-8 a -10 a negativně je ovlivňují. Mezi proteiny inhibující apoptózu patří i některé proteiny využívané virem pro obranu proti atace hostitelského organismu. Tato skupina zahrnuje např. negativní regulátory kaspáz, jako jsou proteiny crmA, P35 nebo v-FLIP (Micheau a kol., 2002).

Apoptóza je zahájena aktivací vnější a/nebo vnitřní signální dráhy. Její vlastní průběh pak ovlivňují mnohé další signální kaskády. Neddůležitější z nich jsou kaskády spojené s proteiny Myc, NF- κ B, MAPK/JNK a PI-3K/AKT (Le a kol., 1999).

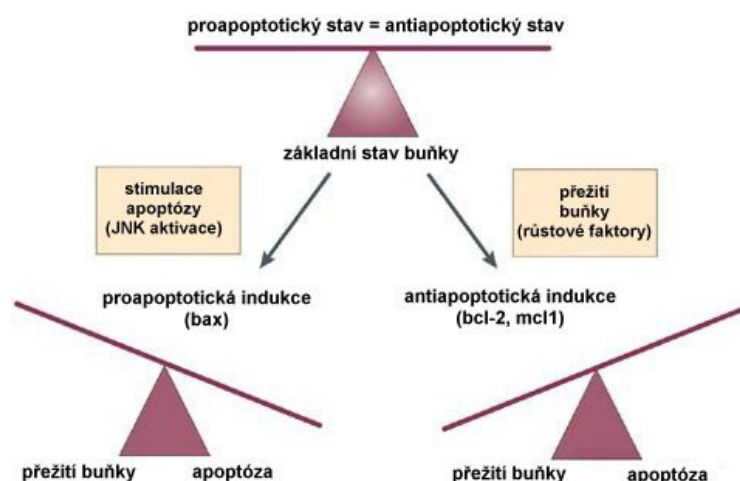
(i) Myc dráha. Tři dosud popsané lidské Myc proteiny regulují rychlost buněčného růstu a přechod mezi G₁ a S fází buněčného cyklu. Zvýšená aktivita Myc proteinů sensitizuje buňky vůči pro-apoptotickým faktorům a vede zejména k aktivaci vnitřní mitochondriální signální dráhy a uvolnění

cytochromu c do cytoplasmy. Jeden z Myc proteinů (c-Myc) také zřejmě pozitivně kooperuje s Fas receptory, a tedy s vnější signální dráhou. Tento protein také může navozovat poškození DNA, neboť aktivuje enzymy produkující kyslíkové radikály.

(ii) NF-κB je obecně považován za protein zprostředkující přežití buněk, nicméně se ukazuje, že v závislosti na typu působící noxy může hrát i proapoptotickou roli. NF-κB se projevuje antiapoptoticky za působení ionizujícího záření, chemoterapeutik a v přítomnosti ligandů receptorů smrti; pak aktivuje anti-apoptotické faktory jako XIAP, FLIP či Bcl-XL. Na druhou stranu, za působení paclitaxelu, p53, virového proteinu LMP1, za fokální ischemie nebo při depleci růstových faktorů je jeho vliv proapoptotický.

(iii) Dráha MAPK kinázy JNK. JNK kináza je člen proteinové superrodiny tzv. MAPK kináz (mitogen-activated protein kinase), které obecně mají nezastupitelnou roli v mnoha buněčných událostech zahrnujících i kontrolu buněčného růstu či apoptózy. Signální dráha JNK kinázy se částečně jeví rozporuplně, nicméně přinejmenším v neuronech byl prokázán její proapoptotický vliv. JNK může m.j. zvyšovat expresi proteinu p53 a Fas/FasL molekul, fosforylovat proapoptotický protein Bad nebo se nepřímo účastnit štěpení proteinu Bid.

(iv) AKT dráha. AKT kináza obecně zprostředkovává signály potencující přežití buněk. Zeslabuje přenos signálu a aktivaci v rámci vnitřní signální dráhy apoptózy, a to fosforylací proteinu Bad nebo inaktivací transkripčních faktorů normálně vedoucích k produkci proapoptotických faktorů, jako jsou Fas ligand či protein Bid. AKT kináza také aktivuje IKK kinázu, pozitivní regulátor NF-κB faktoru. AKT kináza se účastní zeslabování apoptotických dějů navozených deplecí extracelulárních signálních faktorů, oxidativním a osmotickým stresem, iradiací, ischemickým šokem či chemoterapeutiky .



Obr. 3. Schéma tzv. apoptotického reostatu. Pokud je počet proapoptotických (Bax) a antiapoptotických (Bcl-2) proteinů Bcl-2 proteinové rodiny vybalancován, nachází se buňka v základním stavu. Podle Clarke a Tyler, 2009.

2. MITOCHONDRIE A APOPTÓZA

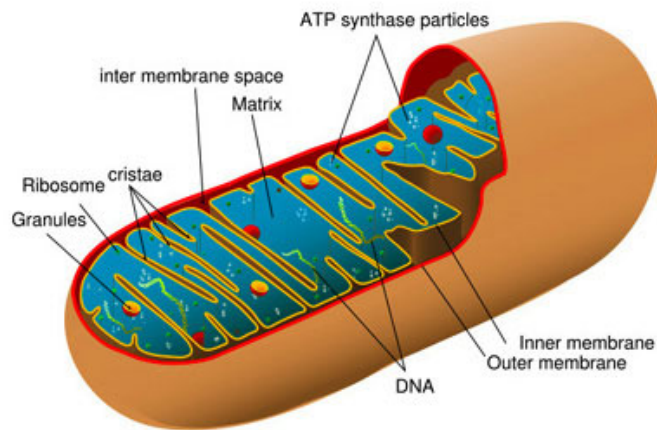
2.1. OBECNÁ FUNKCE A STRUKTURA MITOCHONDRÍÍ

Mitochondrie jsou eukaryotické organely dvěma membránami. Hrají centrální roli v mnoha buněčných funkcích. Jejich výzkum ovlivnil mnoho vědních oborů v posledních cca 150 letech (Ernster a Schatz, 1981). Tyto organely byly posány buď jako niťovité útvary (řecky „mitos“), nebo jako organely zrnkovitého tvaru (řecky „chondros“) v mnoha tkáních. Jejich rozdílné pozorované tvary daly za vznik termínu mitochondrie. Výzkum mitochondrií byl primárně zaměřen na jejich metabolické a energetické funkce, jako oxidativní fosforylaci (OXPHOS), Krebsův cyklus, syntézu hemu, β -oxidaci mastných kyselin nebo metabolismus některých aminokyselin (Ernster a Schatz, 1981). Objev mitochondriální DNA podnítil v 60. letech rozsáhlé diskuze o původu a endosymbióze mitochondrií (Lang a kol., 1999). Dalšími oblastmi zájmu se postupně stalo cílení a import proteinů do mitochondrií (Neupert a Herrmann, 2007) či biogenese Fe/S klastrů (Lill a Kispal, 2000). Dysfunkce těchto organel vede k celé řadě chorob, včetně nejrůznějších neuropatií a myopathií (Wallace, 2005). Akumulace mutací v mitochondriální DNA vede mj. u myši k předčasnému stárnutí (Trifunovic a kol., 2004).

2.1.1. Struktura mitochondrií

Mitochondrie (obr. 4) jsou organely nacházející se ve většině eukaryotických tkání. Některé buňky obsahují jen jednu mitochondrii, jiné jich mohou nést až stovky (Alberts a kol., 2002). Počet různých typů proteinů v mitochondrii je variabilní. V mitochondriích lidského myokardu bylo identifikováno 615 různých proteinů (Taylor a kol., 2003), zatímco v mitochondriích čeledi myšovitých 940 proteinů kódovaných různými geny, ať už jadernými, nebo z mitochondriální DNA (Zhang a kol., 2008).

Každá mitochondrie obsahuje několik funkčních oddílů: vnější mitochondriální membránu, mezimembránový prostor, vnitřní mitochondriální membránu, kristy a matrix. Tato struktura byla prvně popsána v pionýrských pracích Paladeho a Sjoestranda v 50. letech (Palade, 1952; Palade, 1953).



Obr. 4. Schématická struktura mitochondrie.

Převzato z http://scienceblogs.com/worldsfair/2009/05/quite_possibly_the_only_song_d.php

Brzy se ukázalo, že ultrastruktura mitochondrií je velmi variabilní a závisí na typu tkáně, fyziologickém stavu tkáně a vývojovém stádiu (Fawcett, 1981). Standardně popisovaná struktura je následující:

a) Vnější mitochondriální membrána

Vnější mitochondriální membrána (OM) obaluje organelu. Její poměr proteinů a fosfolipidů je podobný jako u plasmatické membrány eukaryotické buňky (asi 1:1 hmotnosti). Obsahuje velké množství integrálních proteinů nazývaných poriny. Poriny formují kanály, které umožní průchod molekulám do velikosti 5 kDa (Alberts a kol., 2002). Větší proteiny vstupují do mitochondrií, pokud obsahují na svém N-konci tzv. signální sekvenci. Pak jsou navázány na vícepodjednotkový komplex nazývaný TOM (translocase of the outer membrane), který je aktivně přenesen (Herrmann a Neupert, 2000). Prasknutí vnější mitochondriální membrány vede k úniku proteinů mezimembránového prostoru do cytosolu a smrti buňky (Chipuk a kol., 2006). OM může být spojena s cisternami endoplasmatického retikula do struktury označované MAM (mitochondria-associated ER-membrane). Toto spojení je důležité z hlediska vápníkové signalizace mezi mitochondrií a endoplasmatickým retikulem a umožňuje i transport lipidů mezi těmito dvěma organelami (Hayashi a kol., 2009).

b) Mezimembránový prostor

Mezimembránový prostor je prostor mezi OM a vnitřní mitochondriální membránou. Vzhledem k tomu, že OM je propustná pro malé molekuly (ionty, cukry), jejich koncentrace v mezimembránovém prostoru je stejná jako v cytoplasmě (Alberts a kol.,

2002). Proteinové složení cytosolu a mezemembránového prostoru se ale liší, neboť se do něj dostanou jen proteiny opatřené signální sekvencí (např. cytochrom c).

c) Vnitřní mitochondriální membrána

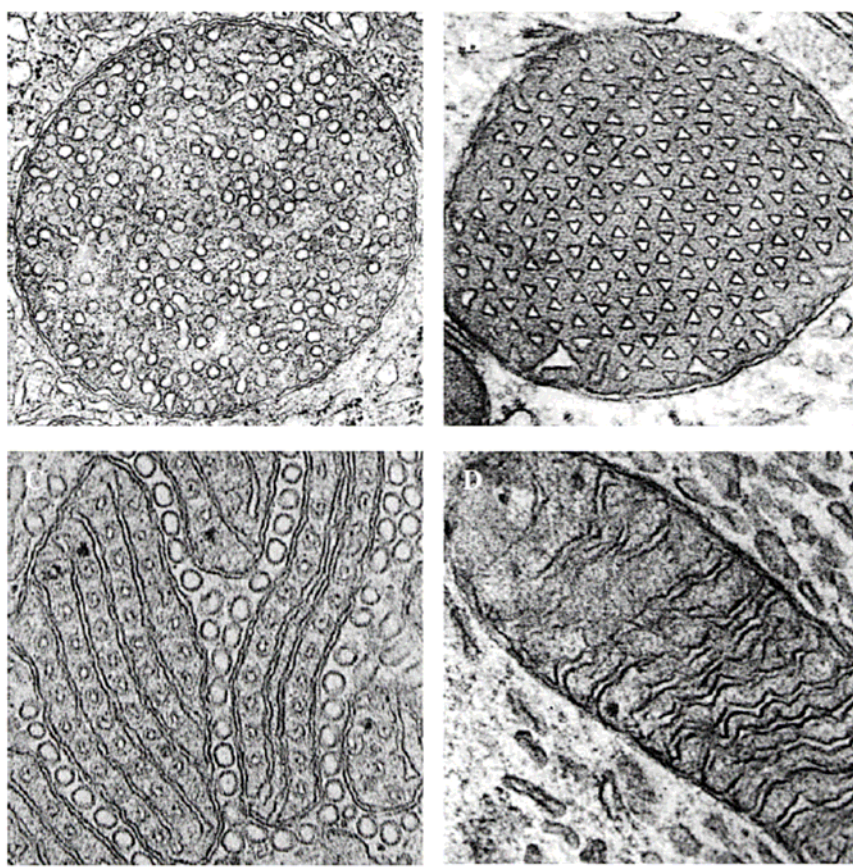
Vnitřní mitochondriální membrána (IM) obsahuje proteiny s různými funkcemi (Alberts a kol., 2002):

1. Proteiny redoxních reakcí OXPHOS systému
2. ATP syntasů tvořící ATP
3. Specifické transportní proteiny regulující přenos metabolitů z matrix
4. Importní proteiny
5. Mitochondriální fúzní (fusion) a štěpící (fission) proteiny.

IM obsahuje asi 150 různých polypeptidů a má vysoký poměr proteinů k fosfolipidům (více než 3:1 váhy, z čehož jde asi o 1 protein na 15 fosfolipidů). Obsahuje asi 20% všech proteinů mitochondrie (Alberts a kol., 2002). Je bohatá na specifický fosfolipid kardiolipin. Kardiolipin byl původně objeven roku 1942 v hovězích srdcích a je typický pro IM a bakteriální membránu (McMillin a Dowhan, 2002). Obsahuje 4 mastné kyseliny místo dvou a pomáhá zvyšovat nepropustnost IM. IM neobsahuje poriny a je obecně vysoce nepropustná. Téměř všechny ionty i molekuly potřebují k přestupu pře IM speciální membránové přenašeče. Do matrix přenáší proteiny TIM komplex (the translocase of the inner membráně) nebo Oxa1 (Herrmann a Neupert, 2000). Na IM je navíc velký gradient potenciálu tvoření proteiny dýchacího řetězce.

d) Kristy

Vnitřní mitochondriální membrána je kompartmentalizována do početných krist – útvarů rozšiřujících vnitřní povrch IM (obr. 5). Pro typickou mitochondrii jater savců je plocha IM asi 5x větší než plocha OM. Tento poměr je u různých typů buněk různý a závisí na energetických potřebách tkáně; např. svalová tkáň obsahuje mitochondrie s vysokým počtem krist. Na kristách se nachází malé kulovité E_1 částice neboli oxysomy. Struktura krist může být různá, od tubulární přes lamelární až pro kristy s trojúhelníkovitým průřezem (Fawcett, 1981).



Obr. 5. Tvary mitochondriálních krist na řezu v elektronovém mikroskopu. Převzato z Fawcetta, 1981.

e) Matrix

Mitochondriální matrix je prostor obklopený vnitřní mitochondriální membránou. Obsahuje asi 2/3 celkového proteinového obsahu mitochondrie (Alberts a kol., 2002). Je důležitá z hlediska produkce ATP ATP syntasou, která je obsažena ve vnitřní mitochondriální membráně. Matrix dále obsahuje stovky enzymů, mitochondriální ribozomy, tRNA a různý počet kopií mitochondriálního genomu. Lidský mitochondriální genom obsahuje 37 genů kódovaných 16 569 páry bází, které mohou být přeloženy v 22 tRNA, 2 rRNA a 13 peptidových genů (Anderson a kol., 1981). Probíhá v ní oxidace pyruvátu a mastných kyselin, stejně jako cyklus kyseliny citronové

2.1.2. Funkce mitochondrií

Vzhledem k tomu, že tato bakalářská práce se týká role mitochondrií v apoptóze, omezím se jen na obecný popis funkce mitochondrií bez detailního popisu dýchacího řetězce a dalších mitochondriálních metabolických pochodů.

Nejdůležitější rolí mitochondrií je produkce ATP, tj. fosforylace ADP během respirace, a regulace energetického metabolismu buňky. Hlavní soubor reakcí zapojených do produkce ATP je

znám pod souhrnným názvem cyklus kyseliny citronové neboli Krebsův cyklus. Tento proces „buněčného dýchání“ je závislý na přítomnosti kyslíku (= aerobní respirace). Probíhá v omezené míře i bez jeho přítomnosti, nicméně produkce ATP je za této anaerobní respirace asi 13x nižší (Alberts a kol., 2002). Rostliny mohou malé množství ATP produkovat i bez přítomnosti kyslíku, kdy jim za alternativní substrát slouží nitrity (Stoimenova a kol., 2007). Během Krebsova cyklu je využíván i provát, který je aktivně transportován přes IM. V matrix je oxidován a spojen s koenzymem A za vzniku acetylkonezemu A (acetyl-CoA). Acetyl-CoA je primární substrát Krebsova cyklu. Postupným zapojováním proteinů elektrotransportního řetězce nakonec vzniká ATP. Při vzniku ATP se uplatňuje silný elektrochemický gradient vzniklý transportem protonů do mezimembránového prostoru. Protony mohou procházet zpět do matrix přes ATP syntesu (F_0F_1 ATPasu), přičemž se využívá právě energie tohoto gradientu na syntézu ATP.

Další funkce mitochondrií zahrnují:

- Produkci tepla díky přítomnosti tzv. odpráhovacích proteinů (uncoupling proteinů, UCP). Tato produkce tepla je typická tzv. hnědou tukovou tkáň a je podstatou fenoménu netřesové termogeneze (Mozo a kol., 2005).
- Skladování iontů vápníku. Koncentrace volného ionizovaného Ca^{2+} je buňkou udržována v řádu stovek nanomolů až desítek mikromolů (Alberts a kol., 2002). V případě masivního vtoku vápníku do buňky musí být Ca^{2+} rychle vypufrován, aby nedošlo k mylné stimulaci systému druhých posílů. Vápník je nejrychleji vychytáván speciálním vápníkovým uniporterem mitochondrií, který jej přenáší přes IM do matrix. Aby nedošlo k osmotickému poškození mitochondrií, je vápník v matrix často precipitován zejména s fosfáty, dokud není postupně uvolněn z mitochondrie a definitivně odstraněn (Miller, 1998).

Mitochondrie se dále účastní

- Regulace membránového potenciálu (Alberts a kol., 2002)
- Procesu apoptózy (Jin a El-Deiry, 2005)
- Regulace buněčné proliferace (McBride a kol., 2006)
- Regulace buněčného metabolismu (McBride a kol., 2006)
- Některých reakcí syntézy hemu (Oh-hama, 1997) nebo
- Syntézy steroidů (Rossier, 2006)

2.2. MITOCHONDRIE V PROCESU APOPTÓZY

Kromě své klíčové role v energetickém metabolismu buňky mají mitochondrie také centrální úlohu v regulaci apoptózy. Integrují početné apoptotické stimuly a jsou zásadní pro iniciaci apoptózy (viz kapitola 1.4.2.). Klíčovým krokem v mitochondriální části apoptotické dráhy je výlev solubilních apoptogenních proteinů z vnější mitochondriální membrány (Jin a El-Deiry, 2005; Suen a kol., 2008). Mitochondrie jsou zapojeny do apoptotických dráh závislých na kaspázách (cytochrom c, SMAC/Diablo, Omi/HtrA2; (Degterev a kol., 2003) i dráh na kaspázách nezávislých, nazývaných CICD (AIF, endonukleasa G; (Kroemer a Martin, 2005). Výlev cytochromu c (cyt c) spouští hlavní dráhy aktivující kaspázy. Tento výlev je velmi masivní. Dochází při něm k uvolnění veškerého cyt c mezimembránového prostoru, což představuje výlev více než 85% celkového množství cyt c v mitochondrii (Bernardi a Azzone, 1981). Cyt c je zapojen do vzniku apoptosomu, aktivace kaspázy-9 a následné aktivace kaspázy-3 (viz kapitola 1.4.2.).

Do cytosolu se také vylévají mitochondriální proteiny souhrnně označované jako SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases). Váží inhibitory apoptotických proteinů (IAPs) a deaktivují je, čímž podporují průběh apoptózy. IAPs potlačují aktivitu kaspáz, výkonných enzymů konečné degradační fáze apoptózy. Změny v propustnosti OMM tedy nepřímo regulují i aktivitu hlavních degradačních enzymů (Zick a kol., 2009).

Osud různých mitochondrií po výlevu cyt c nejspíše nemusí být jednotný. Někteří autoři popisují s výlevem cyt c současný či ihned po něm následující rozpad mitochondrií na malé početné útvary (Suen a kol., 2008). Jiní popisují zachování struktury i membránového potenciálu mitochondrií i po permembrabilizaci její vnější membrány a ustavení rovnováhy mezi cytoplasmatickou a mezimembránovou koncentrací cyt c v mezimembránovém prostoru mitochondrií (von Ahsen a kol., 2000).

Výlev cyt c probíhá přes pór vnější ve vnější mitochondriální membráně (MOMP). Tento pór je formován aktivací a oligomerizací proapoptotických proteinů Bax a Bak (Jin a El-Deiry, 2005; Chipuk a kol., 2006; Danial, 2007). Bax je rozpustný protein lokalizovaný v cytosolu nebo periferně připojený k OMM, zatímco Bak je přímo protein OMM (Danial, 2007). Ke vzniku póru v OMM je pravděpodobně nezbytná mezimembránová oligomerizace proteinů Bax a Bak (Chipuk a kol., 2006). Zatím však není zcela jasné, zda je vznik MOMP a výlev cyt c podmíněn vznikem pouze Bax-póru nebo vyžaduje vznik hybridního póru Bax/Bak (Danial, 2007).

Proteinům Bax, Bak a dalším pro- i antiapoptotickým členům Bcl-2 rodiny je věnována poslední kapitola této práce.

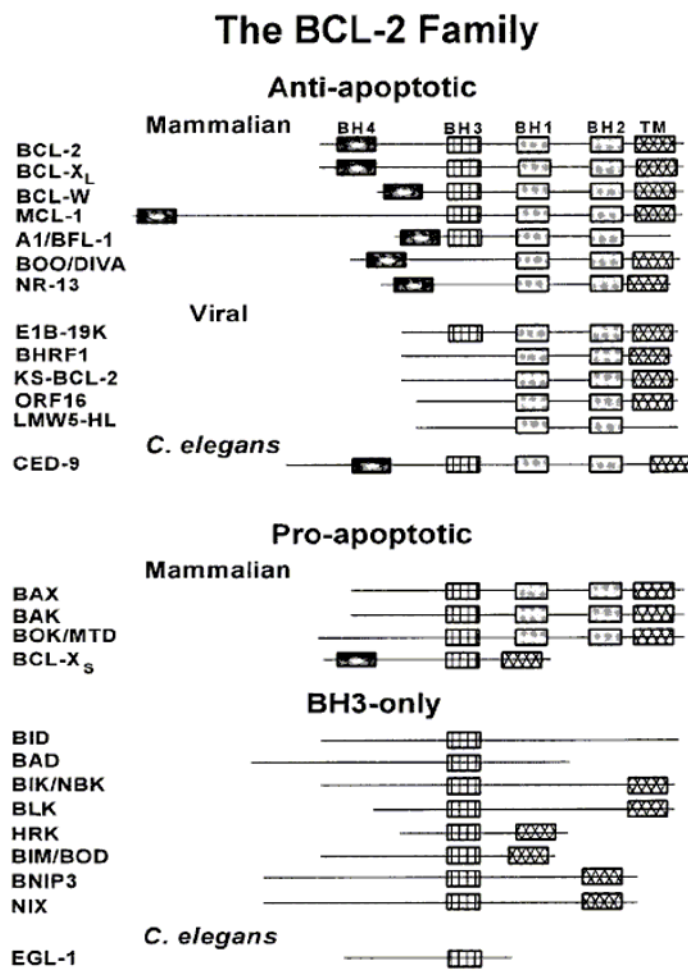
3. PROTEINY BCL-2 RODINY

Klíčovými regulátory apoptózy jsou proteiny Bcl-2 tzv. rodiny. Dnes je známo více než 25 členů této rozsáhlé proteinové rodiny. Protein Bcl-2 byl původně popsán v B-buňkách maligního lymfomu (B-cell lymphoma), proto je také označován jako Bcl protein (Tsujimoto a kol., 1985). Bcl proteiny jsou obvykle děleny do tří skupin, z čehož jsou dvě skupiny proapoptotické a jedna skupina antiapoptotická. Všechny tyto proteiny obsahují alespoň jednu ze čtyř konzervovaných BH (Bcl-2 homologních) domén, označovaných jako BH1-4. Antipapoptotické proteiny obsahují všechny 4 BH domény. Proteiny antiapoptotické nesou buď domény BH1, BH2 a BH3 (jako např. proteiny Bak a Bax), nebo jen doménu BH3 a pak jsou označovány jako tzv. BH3-only proteiny (Bim, Bid, Bad a jiné) (Danial, 2007). Stručný přehled a grafické znázornění členů Bcl-2 rodiny je v tabulce 2. Grafický přehled zástupců Bcl-2 rodiny s počty jejich BH domén poskytuje obrázek 6.

Tab. 2. Přehled vybraných proteinů Bcl-2 rodiny. Podle Danial 2007.

Skupina Bcl-2 proteinů	Domény	Zástupci savčích Bcl-2 proteinů
I. antiapoptotické	BH1, BH2, BH3, BH4	Mcl-1, Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-w, Bfl-1/A1, Diva, NR-13
II. proapoptotické	BH1, BH2, BH3	Bok/MTD, Bak, Bax, Bcl-Xs
III. proapoptotické, tzv. BH3-only	BH3	Bim, Bid, Puma, Bmf, Bad, Bik, Hrk, Noxa, Nix

BH domény odpovídají α -helikálním segmentům podmiňujícím strukturu a funkci těchto proteinů. Někteří zástupci Bcl-2 rodiny se vyskytují i na vnitrobuněčných membránách, neboť obsahují též transmembránovou doménu (TM). Strukturně se skládají ze dvou centrálních hydrofobních α -helixů obklopených šesti nebo sedmi amfipatickými α -helixy. Tato topografie je podobná póry-formujícím doménám bakteriálních toxinů (Petros a kol., 2004).



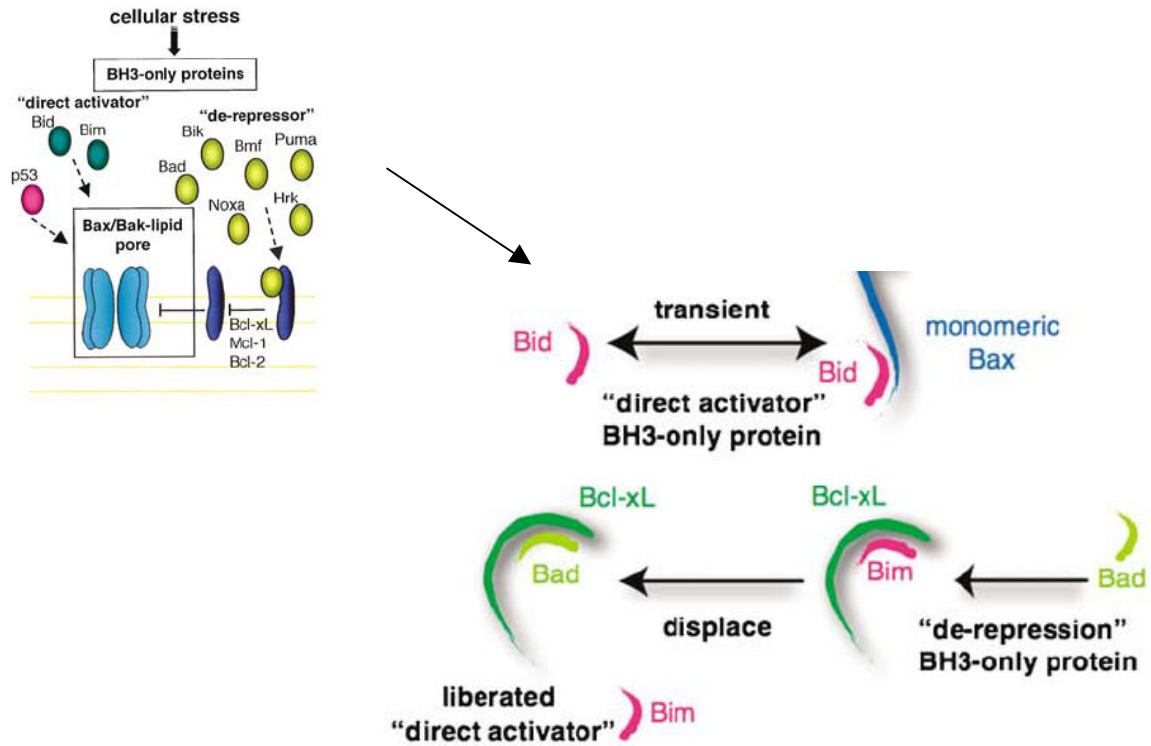
Obr. 6. Stručný přehled členů Bcl-2 rodiny. Obdélníky je znázorněna přítomnost jedné až všech čtyřech BH domén v molekule proteinu. Převzato z Korsmeyer a kol., 2000.

Kritickým bodem, jehož překročení buňku nenávratně směřuje k apoptotické smrti, je vznik póru ve vnější mitochondriální membráně a výlev cytochromu c a dalších proteinů mezimembránového prostoru mitochondrie do cytosolu (viz kap 1.4.2.). Vznik tohoto póru tvořeného proteiny Bax a/nebo Bak a vzrůst permeability OMM reguluje vzájemně propojená síť pro- a antiapoptotických Bcl-2 proteinů (Danial, 2007 aj.).

Aktivace a následná odligomerizace proapoptotických proteinů Bax a Bak je jinými proapoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny řízena v zásadě dvěma možnými způsoby (obr. 7, Chipuk a kol., 2008):

- a) Přímou „aktivací“. Ta je podložena interakcí proteinů Bax a Bak s proteiny Bid, Bim nebo p53. Navodí oligomerizaci proteinů Bax a Bax a vznik póru ve vnější mitochondriální membráně.

- b) Cestou „de-represe“. Tohoto způsobu aktivace proteinů Bax a Bak se účastní Bcl-2 proteiny označované jako de-represory nebo sensitizéry. Patří mezi ně proteiny Bad, Bik, Bmf, Puma, Noxa či Hrk. De-represory vyvazují antiapoptotické proteiny (např. Bcl-XL nebo MCL-1) spojené s proteiny Bax a Bak, Poté, co je z proteinů Bax a Bak odstraní sekvestrací, mohou Bax a Bak oligomerizovat za vzniku póru v OMM.



Obr. 7. Možné cesty vzniku póru ve vnější mitochondriální membráně vzájemnou interakcí proteinů Bcl-2 rodiny. Bližší podrobnosti viz text. Převzato z Chipuk a kol., 2008.

3.1. SKUPINA I – BCL-2 A BCL-2 LIKE ANTIAPOPTOTICKÉ PROTEINY

Zástupci této skupiny jsou u savců proteiny Bcl-XL, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-B, Bfl-1, Diva a NR-13. Tvoří je tři až čtyři BH domény, bez kterých by nebyly schopny plnit svou antiapoptotickou úlohu. Domény BH1 – BH4 zprostředkují interakci s dalšími proteiny a molekulami vnější mitochondriální membrány, endoplazmatického retikula (ER) a jaderné membrány. Všechny čtyři BH domény obsahují proteiny Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w (a také Ced-9 protein z *C. elegans*), domény BH1-3 obsahují zbylí zástupci této skupiny a také jim strukturně i funkčně podobné proteiny BHRF1 z viru Epstein-Barrové nebo KSHV-Bcl-2 protein z viru Kaposiho sarkomu (Petros a kol., 2004). BH domény těchto proteinů formují hydrofobní kapsičku, jejíž dno leží mezi helixy α_3 a α_4 . Součástí této kapsy jsou zejména BH3 domény, takže Bcl-2 proteiny této skupiny nemohou oligomerizovat. Mohou ale tvořit antiapoptotické heterodimery s Bax a Bak (Petros a kol., 2004).

N-koncová BH4 doména překrývá ostatní hydrofobní části. Tím je stabilizuje a umožňuje proteinu vykonávat svou antiapoptotickou funkci. Mezi doménami BH3 a BH4 se nachází nestrukturovaná smyčka, která je regulačně fosforylována. To vede k inaktivaci antiapoptotické funkce této skupiny proteinů. Jiným posttranslačním regulačním mechanismem je může být štěpení kaspázou (Danial, 2007). Kaspáza odstraní N-terminální BH4 doménu a Bcl-2 like antiapoptotické faktory jsou konvertovány na proapoptotické proteiny. Proteiny této skupiny nepodporují proliferaci, ale spíše aktivně blokuji apoptózu (Petros a kol., 2004).

3.1.1. Bcl-X

První publikovaná studie zabývající se strukturou lidského Bcl-2 proteinu se týkala proteinu Bcl-X. Tento protein se vyskytuje ve dvou nestříhových variantách. Jednou z nich je antiapoptotická forma Bcl-Xl (long form), již se týkala ona první publikovaná práce popisující strukturu lidského Bcl-2 proteinu. Na této struktuře byla popsána i mezi Bcl-2 proteiny vysoce konzervativní aminokyselinová „NWGR“ sekvence sequence, nacházející se před $\alpha 5$ helixem (Muchmore a kol., 1996). Bcl-Xl je tvořen dvěma centrálními helixy ($\alpha 5$ a $\alpha 6$) obloženými dalšími z jedné strany helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$ a z druhé strany helixy $\alpha 3$ a $\alpha 4$. Helixy navzájem propojují různě dlouhé smyčky. Centrální helixy jsou značně hydrofobní. Mezi helixy $\alpha 1$ a $\alpha 2$ se nachází netypická, poměrně dlouhá nestrukturovaná smyčka. Tato smyčka ale zřejmě neovlivňuje antiapoptotickou aktivitu tohoto proteinu (Petros a kol., 2004; Danial, 2007).

Druhou formou Bcl-Xl proteinu vzniklou sestříhem je Bcl-Xs (short form). Tento protein nejpíš negativně reguluje proteiny Bcl-2 a Bcl-Xl a na rozdíl od membránově vázaného Bcl-Xl je to protein cytosolický (Petros a kol., 2004).

Na struktuře proteinu Bcl-Xl byla prokázána úloha dna „kapsičky“ formovaného $\alpha 3$ a $\alpha 4$ helixy mezi BH1-3 doménami pro vznik komplexu s pro-apoptotickými proteiny. Jde o vazebné místo, dky němuž vzniká komplex např. s proteiny Bak či Bad (Petros a kol., 2004).

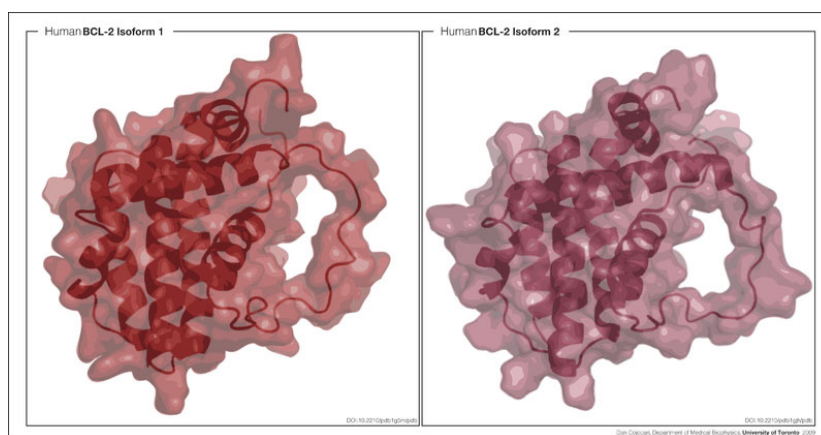
3.1.2. Bcl-2

Bcl-2 protein (obr. 8) je antiapoptotický protein o velikosti 26 kDa. Skládá se z 8 α -helixů. Stejně jako Bcl-Xl nese na svém povrchu hydrofobní „kapsičku“, která je však oproti proteinu Bcl-Xl na strane $\alpha 3$ helixu o něco širší a delší, což je zřejmě dáno vyšším počtem hydrofobních aminokyselin v této kapse v případě proteinu Bcl-Xl. Díky tomu je vazba proapoptotických proteinů na Bcl-2 asi 10× slabší než na Bcl-Xl (Petros a kol., 2004).

Bcl-2 se nachází v membránách mitochondrií, ER a v perinukleární membráně. Napomáhá udržování buněčné homeostázy a vyvažuje interakce mezi jednotlivými členy Bcl-2 rodiny. V dospělém savčím organismu se nicméně nachází spíše v periodicky se obnovujících tkáních

(endometrium aj.). Jeho role je podstatná embryonálně; myši knock-outované pro Bcl-2 vykazují např. hematopoetické poruchy nebo defekty ve vývoji ledvin (Jin a El-Deiry, 2005).

Bcl-2 vyvazuje některé pro-apoptotické proteiny, čímž brání jejich oligomerizaci a inserci do vnější mitochondriální membrány. Komplexy formuje, podobně jako Bcl-XL, zejména s proteiny Bak či Bad (Danial, 2007). Význam lokalizace Bcl-2 v jaderné membráně zatím nebyl popsán. V rámci mitochondriální membrány ovlivňuje Bcl-2 homeostázu Ca^{2+} iontů. Při výlevu vápníku z cisterem ER obvykle dochází k jeho vychytávání mitochondriemi. Koncentrace vápníku v matrix od určité hodnoty následně inhibuje oxidativní fosforylaci. Děje se tak zvýšenou asociací inhibiční podjednotky ATP syntázy (Gogvadze a kol., 2009). Bcl-2 také může tvořit shluky v prostoru mezi IMM a OMM a podílet se na vzniku PTP póru, který může sloužit jako vápníkový kanál (Chao a Korsmeyer, 1998).



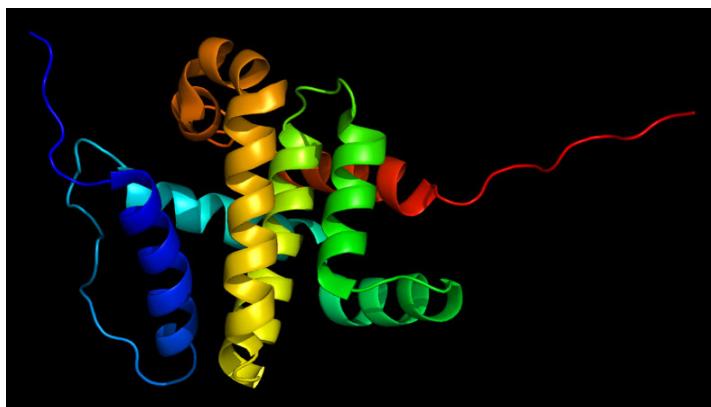
Obr. 8. Modely 3D struktury dvou isoform lidského Bcl-2 proteinu.
Převzato z http://en.wikipedia.org/wiki/File:BCL-2_human.png

3.1.3. Bcl-w

Struktura i funkce anti-apoptického Bcl-w proteinu (obr. 9) je velmi podobná struktuře ostatních členů této skupiny. I Bcl-w je formován dvěma převážně hydrofobními α -helixy, obklopenými helixy dalšími (Petros a kol., 2004).

Strukturální zvláštností Bcl-w proteinu je přítomnost přídatného C-koncového α -helixu, který vstupuje do hydrofobní „kapsičky“ proteinu. Podobný helix se nachází i v kavitě proapoptického proteinu Bax, což snižuje vazebnou aktivitu BH3 proteinů na Bcl-w. V případě proteinu Bcl-w je ovšem tento helix podstatně pohyblivější než zbylé helixy proteinu a zřejmě se podílí na vazebné autoregulaci proteinu Bcl-w (Petros a kol., 2004).

Nachází se v mitochondriálních membránách téměř ve všech tkáních. Jeho hladiny jsou nejvyšší v mozku a míše, pankreatu, srdci či prsních žlázách. Je nezbytný pro spermatogenezi u myši, u kterých leží na chromosomu 14 stejně jako u člověka (Kirkin a kol., 2004).



Obr. 9. Stuhový model 3D struktury lidského Bcl-w proteinu.

Převzato z http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a7/Protein_BCL2L2_PDB_1mk3.png

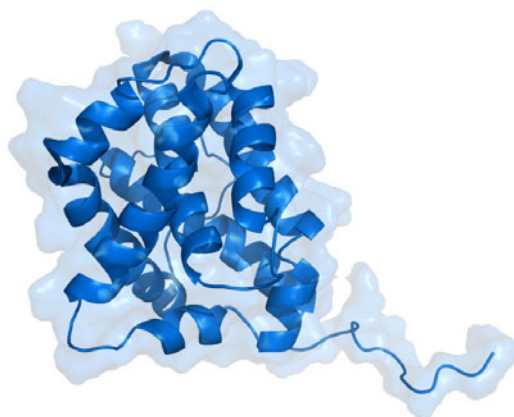
3.2. SKUPINA II. – BH123 PROTEINY

Skupina tzv. BH123 proteinů sdílí s Bcl-2 proteinem domény BH1 – BH3. Zahrnuje proapoptické proteiny Bax, Bak a Bok. Jejich 3D struktura představuje podobně jako u Bcl-2 globulární seskupení α -helixů s povrchovou vazebnou hydrofobní „kapsičkou“. Expresce proteinů Bax, Bak a Bok se různí. Zatímco protein Bok je exprimován v menším množství tkání, Bax a Bak jsou exprimovány širěji a jsou klíčové pro spuštění mitochondriální části apoptotické dráhy (Kirkin a kol., 2004). Bax a Bak deficicientní buňky nejsou schopny uvolnit cyt c z mezimembránového protonu mitochondrií a jsou resistentní vůči stimulům aktivujícím vnitřní apoptotickou kaskádu. Jejich deficit nebo mutace vede k jejich neschopnosti vyvazovat represory apoptózy, jako jsou Bcl-2 či Bcl-w (Danial, 2007).

3.2.1. Bax

3D strukturu proteinu Bax (obr. 10) tvoří sedm amfipatických helixů seskupených okolo dvou dvou centrálních α -helixů hydrofobních. I on obsahuje dlouhou nestrukturovanou smyčku mezi helixy α 1 a α 2. Je exprimován v několika isoformách, které se překrývají tkáňovou specifikou. Bax se vyskytuje např. v slezině, mozku, reprodukčních tkáních, plicích, střevu či v kůži, kde je ovšem exprimován v nízkých hladinách. V buňce se vyskytuje v cytoplasmě nebo periferně vázán k mitochondriální (Jin a El-Deiry, 2005). Za fyziologického stavu se vykytuje jako solubilní monomer, jehož C-koncová doména nebytná pro vazbu do OMM je sbalena do regulační „kapsičky“ na jeho povrchu (Petros a kol., 2004). Tato „ukrytí“ vazebného helixu také zvyšuje solubilitu proteinu Bax. Po spuštění apoptózy dojde uvolnění C-koncové domény z „kapsičky“ a její inserci do OMM. Bax následně homooligomerizuje a může interagovat s latentními „zásobními“ Bax molekulami už lokalizovanými v OMM, stejně jako s proteinem Bak a dalšími proteiny OMM. Konečným výsledkem

je vznik póru, premeabilizace OMM a uvolnění cyt c a dalších látek do cytoplasmy. Není ovšem zatím zcela jasné, zda homodimery proteinu Bax namísto tvorbu pórů v OMM spíše neovlivňují propustnost mitochondriálních kanálů už existujících (Danial, 2007). Podle některých studií nemusí protein Bax ani oligomerizovat, ale stabilní inserce do OMM navodí i přímá aktivace proteinem tBid nebo proteinem Bim, která za spoluúčasti mitochondriálního kardiolipinu vede k takovým konformačním změnám, jež navodí inserce helixů $\alpha 5$ a $\alpha 6$ do OMM (Chipuk a kol., 2006; Kuwana a kol., 2005). Všeobecně je ovšem rozšířenější nepřímý model aktivace, podle kterého může být C-koncoá doména lokalizovaná do „kapsičky“ vlastního Bax proteinu navázaná i do „kapsičky“ antiapoptotických proteinů výše uvedené skupiny. Bax (i bak) jsou touto represorovou vazbou inaktivovány a další fázi apoptózy spouští jejich dereprese pomocí BH3 proteinů (Petros a kol., 2004; Jin a El-Deiry, 2005; Danial, 2007).



Obr. 10. Stužkový model 3D struktury Bax proteinu.

Převzato z http://en.wikipedia.org/wiki/File:BAX_protein_1F16.png

3.2.2. Bak a Bok

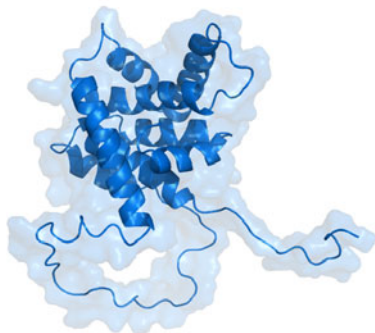
Proteiny Bak a Bok jsou malé proteiny (tvořené 212 a 211 aminokyselinovými zbytky), které jsou oproti proteinu Bax membránově vázané. Jejich exprese je omezenější než proteinu Bax. Bak dosahuje nejvyšší míry exprese v kosterní a srdeční svalovině, Bok v mozku, játrech či lymfoidní tkáni. Oligomerizace proteinu Bak je v OMM inhibována ionty zinku a přítomností napětově ovládaného aniontového kanálu (VDAC). Vazbu VDAC na Bak mohou selektivně odtraňovat některé BH3 proteiny (Petros a kol., 2004; Jin a El-Deiry, 2005). Protein Bak se (podobně jako aktivovaný Bax) nachází také v membráně ER. Vzhledem k tomu, že proces apoptózy výrazně ovlivňují i vstup Ca^{2+} uvolněného z cisteren ER, mohou proteiny Bak a Bax hrát významnou roli v Ca^{2+} homeostáze např. při oxidativním stresu (Danial, 2007).

3.3. SKUPINA III. – BH3-ONLY PROTEINY

Tato skupina proteinů obsahuje ve své struktuře jen BH3 doménu. Zahrnuje mj. proteiny Bid, Bim, Bmf, Bad, Bik, Puma a Noxa, které selektivně reagují na přicházející apoptotické stimuly a buněčnou smrt navozují zejména interakcemi s proteiny Bax a Bak. Jejich aktivace zahrnuje postranskripční nebo postranlační úpravy, např. štěpení či fosforylaci (Jin a El-Deiry, 2005). Tyto úpravy jsou pro každým proteinů této skupiny specifické a do určité míry podmiňují různost a specifitu odpovědi toho kterého proteinu na vybraný apoptotický signál. Fungují obvykle tak, že se svou jedinou BH doménou váží do hydrofobních kavit multidoménových Bcl proteinů předešlých skupin. V důsledku tak brání vazbě antiapoptotických molekul na molekuly proapoptotické. Jiným modelem je přímá aktivace předešlých proapoptotických molekul, která je zřejmě specifická zejména pro BH3-only proteiny Bid a Bim (Petros a kol., 2004; Danial, 2007).

3.3.1. Bid

Bid (obr. 11) je za fyziologického stavu solubilní, apoptoticky inaktivní protein. V přítomnosti apoptotických stimulů je štěpen kaspázou-8, což vede k uvolnění jeho BH3 domény a vzniku aktivní formy, označované jako tBid (Wang a kol., 1996b). tBid se apoptózy účastní dvěma možnými způsoby: vazebnou inaktivací Bcl-2-like antiapoptotických proteinů, ale může také tvořit v mitochondriální membráně homotrimery, což může způsobit oligomerizaci Bak a Bax (Kirkin a kol., 2004). 3D struktura proteinu Bid je víceméně shodná s proteiny Bcl-2 nebo Bcl-Xl. Výrazně se však liší N-koncovým helixem. Bid obsahuje oproti Bcl-Xl α -helix, který je antiparalelní k helixu $\alpha 1$ a následuje po něm také nestrukturovaná dlouhá smyčka napojující helix $\alpha 2$. Tato smyčka je místem štěpení kaspázou-8. Antiparalelní helix proteinu Bid odpovídá BH3 doméně proteinu Bcl-Xl. Hydrofobní „kapička“ proteinu Bid je plochá a neumožňuje formování homo- nebo hetetomerů s jinými členy Bcl-2 rodiny (Petros a kol., 2004).



Obr. 11. Stuhlý model 3D struktury proteinu Bid.

Převzato z http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/BID_protein_2bid.png.

3.3.2. Bim

Bim je protein o velikosti 198 aminokyselin. Váže a tím funkčně inaktivuje antiapoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-XL či Mcl-1, ale s proteiny Bad a Bok zřejmě schopen interakce není (Kirkin a kol., 2004). Zdá se ale, že může přímo aktivovat proteiny Bak a Bax (Danial, 2007). Se svými vazebnými partnery formuje heterodimery insertované do různých částí endomembránového systému, nejen do OMM. Existuje v několika isoformách, z nichž z hlediska indukce apoptózy má největší význam isoforma BidL. Může také inaktivovat napěťově ovládaný aniontový kanál. Vyskytuje se v endomembránovém systému různých typů tkání.

3.3.3. Bmf

Bmf interaguje s celou řadou antiapoptotických proteinů Bcl-2 rodiny. Za fyziologického stavu je sekvestrován s mikrotubuly a lehkými řetězci dyneinu. Byl popsán ve třech isoformách, ze kterých je apoptoticky nejpotentnější isoforma 1, exprimovaná v lymfoidní tkáni. Bmf reaguje na specifické apoptotické stimuly, jako je např. ztráta extracelulární matrix. Spuští anoikis (Kirkin a kol., 2004) a nebo iniciuje apoptotické kaskády navozené ozářením UV světlem (Puthalakath a kol., 1999).

3.3.4. Bad a Bik

Bad protein pozitivně reguluje apoptózu vyvazování antiapoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-XL, čímž zabrání jejich vazbě na proapoptotický protein Bax. Jeho aktivita je regulována fosforylací a sekvestrací s proteiny 14-3-3. Deprivace cytokinů a růstových faktorů nebo ztráta extracelulární matrix vede k inaktivaci AKT, takže Bad může být defosforylován, přesunut do cytoplasmy a aktivován (Kirkin a kol., 2004). Fosforylací je regulován protein Bik, lokalizovaný v OMM nebo jaderné obálce. Bik také vyvazuje Bcl-2 a Bcl-XL.

3.3.5. Puma a Noxa

Proteiny Puma a Noxa zprostředkují zejména apoptotickou odpověď na genotoxické poškození. Jsou primárně regulovány na transkripční úrovni. Byla posána jejich transaktivace proteinem p53 (Danial, 2007). Hladina proteinu Puma (p53 up-regulated modulator of apoptosis) je tedy aktivována zejména poškozením jaderné DNA. Expresi proteinu Puma může zvyšovat i nedostatek růstových faktorů nebo vysoké hladiny glukokortikoidů či forbolesteru (Ekoff a kol., 2007). Puma je silnější aktivátor apoptózy než Noxa. Váže se na všechny antiapoptotické Bcl proteiny. Noxa specificky vyvazuje proteiny Mcl-1 a Bcl-XL (Seo a kol., 2003).

ZÁVĚR

Proces apoptózy je založen na konzervovaných genetických a biochemických drahách, jejichž základní části jsou přítomny u všech metazoi. U savců je apoptóza řízena dvěma molekulárními programy, vnější a vnitřní signální dráhou, které finálně vedou k aktivaci některých členů kaspázové rodiny. Aktivací konečných enzymů apoptotické kaskády předchází výlev cytochromu c a některých dalších proteinů z mitochondrií. Identifikace cytochromu c jako apoptogenního faktoru uvolňovaného z mitochondrií vedla k odskrytí významu těchto organel v procesu apoptózy.

Apoptóza je proces velmi přísně regulovaný. Iniciace apoptotické kaskády závisí na aktivaci vnější a/nebo vnitřní signální dráhy. Vlastní průběh apoptózy může být ovlivněn v několika dalších bodech těchto drah. Mezi klíčové regulační molekuly procesu apoptózy patří proteiny tzv. Bcl-2 rodiny. Ovlivňují průběh apoptózy pozitivně i negativně. Více než dvě desítky členů Bcl-2 rodiny jsou propojeny v složitou regulační síť, která může poměrem exprese a aktivity svých členů osud buňky zvrátit buď k přežití, nebo k apoptotické smrti.

Proteiny Bcl-2 rodiny jsou členěny do tří skupin, z nichž dvě jsou proapoptotické a jednu tvoří antiapoptotičtí zástupci. Antiapoptotičtí zástupci (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 nebo A1) vyvažují nebo inhibují působení zástupců proapoptotických, kteří slouží buď jako senzory buněčného poškození (Bim, Bid, Puma, Noxa, Bad), nebo spouštějí konečnou fázi apoptózy např. permeabilizací vnější mitochondriální membrány (Bax, Bak). Právě vznik póru ve vnější mitochondriální membráně, podložený aktivací a oligomerizací proteinů Bax a Bak, a následný výlev cytochromu c, bývají označovány jako „point of no return“ – tedy okamžik v celé apoptotické kaskádě, který buňku definitivně předurčí k záhubě.

Vybalancování proapoptotických a antiapoptotických faktorů a jejich vzájemná regulace vede k udržování kvalitní tkáňové homeostázy. Pokud je některá z regulačních vazeb porušena, dochází k vážným onemocněním. V případě zvýšené apoptotické aktivity a převaze apoptózy nad proliferací můžeme pozorovat různá degenrativní či autoimunitní onemocnění. Zvýšená apoptotická aktivita byla pozorována i u nemocných s AIDS, kde nicméně jde spíše o projev sekundární. V případě utlumené či neprobíhající apoptózy bývá často pozorována některá z forem maligní transformace, tedy rakovinné bujení. Nádorová buňka je pak necitlivá k inhibitorům růstu a nepodléhá apoptóze.

V ČR je rakovina po kardiovaskulárních nemocech druhou nejčastější příčinou úmrtí. Každoročně na ni umírá zhruba 30 tisíc pacientů. Poznání regulačních mechanismů apoptotických drah je jedním ze způsobů, jak potenciálně nalézt léky namířené proti konkrétním cílům, např. nadměrně exprimovaným pro- nebo antiapoptotickým regulačním proteinům. Taková farmaka by nepochybně minimalizovala nepříjemné vedlejší účinky současné dostupné onkologické terapie a zároveň by mohla být terapeuticky účinnější.

SEZNAM LITERATURY

Abe, H., M. A. Shibata a Y. Otsuki (2006). **Caspase cascade of Fas-mediated apoptosis in human normal endometrium and endometrial carcinoma cells.** *Mol Hum Reprod* **12**(9): 535-541.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts a P. Walter (2002). **Molecular biology of the cell.** New York, New York: Garland Science.

Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden a I. G. Young (1981). **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** *Nature* **290**(5806): 457-465.

Bernardi, P. a G. F. Azzone (1981). **Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes.** *J Biol Chem* **256**(14): 7187-7192.

Brustmann, H. (2007). **Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and DNA-fragmentation factor (DFF45): expression and correlation in normal, hyperplastic and neoplastic endometrial tissues.** *Pathol Res Pract* **203**(2): 65-72.

Clarke, P. a K. L. Tyler (2009). **Apoptosis in animal models of virus-induced disease.** *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 144-155.

Cowling, V. a J. Downward (2002). **Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain.** *Cell Death Differ* **9**(10): 1046-1056.

Danial, N. N. (2007). **BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death.** *Clin Cancer Res* **13**(24): 7254-7263.

Degterev, A., M. Boyce a J. Yuan (2003). **A decade of caspases.** *Oncogene* **22**(53): 8543-8567.

Ekoff, M., T. Kaufmann, M. Engstrom, N. Motoyama, A. Villunger, J. I. Jonsson, A. Strasser a G. Nilsson (2007). **The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells.** *Blood* **110**(9): 3209-3217.

Ernster, L. a G. Schatz (1981). **Mitochondria: a historical review.** *J Cell Biol* **91**(3 Pt 2): 227s-255s.

Fawcett, D. W. (1981). **Mitochondria.** *The Cell.* W. B. Saunders. Philadelphia.

Gaido, M. L. a J. A. Cidlowski (1991). **Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B.** *J Biol Chem* **266**(28): 18580-18585.

Ganong, W. F. (2005). **Přehled lékařské fyziologie.** Praha, Galén.

Glucksmann, A. (1951). **Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.** *Biol Rev* **26**: 5-86.

Gogvadze, V., S. Orrenius a B. Zhivotovsky (2009). **Mitochondria as targets for cancer chemotherapy.** *Semin Cancer Biol* **19**(1): 57-66.

Gross, A., X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst a S. J. Korsmeyer (1999). **Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for**

cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* **274**(2): 1156-1163.

Hayashi, T., R. Rizzuto, G. Hajnoczky a T. P. Su (2009). **MAM: more than just a housekeeper.** *Trends Cell Biol* **19**(2): 81-88.

Herrmann, J. M. a W. Neupert (2000). **Protein transport into mitochondria.** *Curr Opin Microbiol* **3**(2): 210-214.

Holcik, M., E. LaCasse, A. E. MacKenzie a R. Korneluk (2005). **Apoptosis in Health and Disease - Clinical and therapeutical aspects.** Cambridge.

Hsu, H., J. Xiong a D. V. Goeddel (1995). **The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.** *Cell* **81**(4): 495-504.

http://en.wikipedia.org/wiki/Carl_Vogt http://en.wikipedia.org/wiki/Carl_Vogt.

Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes a D. R. Green (2006). **Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario.** *Cell Death Differ* **13**(8): 1396-1402.

Jiang, X. a X. Wang (2004). **Cytochrome C-mediated apoptosis.** *Annu Rev Biochem* **73**: 87-106.

Jin, Z. a W. S. El-Deiry (2005). **Overview of cell death signaling pathways.** *Cancer Biol Ther* **4**(2): 139-163.

Kashiwagi, A., H. Hanada, M. Yabuki, T. Kanno, R. Ishisaka, J. Sasaki, M. Inoue a K. Utsumi (1999). **Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis.** *Free Radic Biol Med* **26**(7-8): 1001-1009.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie a A. R. Currie (1972). **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.

Kirkin, V., S. Joos a M. Zornig (2004). **The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis.** *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 229-249.

Kokawa, K., T. Shikone, T. Otani, R. Nishiyama, Y. Ishii, S. Yagi a M. Yamoto (2001). **Apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in patients with endometrioid, clear cell, and serous carcinomas of the uterine endometrium.** *Gynecol Oncol* **81**(2): 178-183.

Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh a P. H. Schlesinger (2000). **Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c.** *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-1173.

Kroemer, G. a S. J. Martin (2005). **Caspase-independent cell death.** *Nat Med* **11**(7): 725-730.

Kumar, R., P. E. Herbert a A. N. Warrens (2005). **An introduction to death receptors in apoptosis.** *Int J Surg* **3**(4): 268-277.

Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, J. E. Chipuk, C. Bonzon, B. A. Sullivan, D. R. Green a D. D. Newmeyer (2005). **BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly.** *Mol Cell* **17**(4): 525-535.

Kvasnicka, J. a J. Petrasek (1995). **[Apoptosis--programmed cell death].** *Cas Lek Cesk* **134**(9): 259-264.

LaCasse, E. C., S. Baird, R. G. Korneluk a A. E. MacKenzie (1998). **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* **17**(25): 3247-3259.

Lang, B. F., M. W. Gray a G. Burger (1999). **Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes.** *Annu Rev Genet* **33**: 351-397.

Le, M. G., M. C. Mathieu, S. Douc-Rasy, M. L. Le Bihan, H. Adb El All, M. Spielmann a G. Riou (1999). **c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients.** *Int J Cancer* **84**(6): 562-567.

Lill, R. a G. Kispal (2000). **Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria.** *Trends Biochem Sci* **25**(8): 352-356.

Liotta, L. A. a E. Kohn (2004). **Anoikis: cancer and the homeless cell.** *Nature* **430**(7003): 973-974.

McBride, H. M., M. Neuspiel a S. Wasiak (2006). **Mitochondria: more than just a powerhouse.** *Curr Biol* **16**(14): R551-560.

McMillin, J. B. a W. Dowhan (2002). **Cardiolipin and apoptosis.** *Biochim Biophys Acta* **1585**(2-3): 97-107.

Meijerink, J. P., E. J. Mensink, K. Wang, T. W. Sedlak, A. W. Sloetjes, T. de Witte, G. Waksman a S. J. Korsmeyer (1998). **Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX.** *Blood* **91**(8): 2991-2997.

Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand a M. G. Grutter (2002). **The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex.** *J Biol Chem* **277**(47): 45162-45171.

Miller, R. J. (1998). **Mitochondria - the Kraken wakes!** *Trends Neurosci* **21**(3): 95-97.

Mozo, J., Y. Emre, F. Bouillaud, D. Ricquier a F. Criscuolo (2005). **Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds?** *Biosci Rep* **25**(3-4): 227-249.

Muchmore, S.W., Sattler, H., Liang, Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.C. a Fesik, S.W. (1996). **X-ray and NMR structure of human Bcl-XL.** *Nature* **381**: 335– 341.

Muller, M., C. A. Scaffidi, P. R. Galle, W. Stremmel a P. H. Krammer (1998). **The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis.** *Eur Cytokine Netw* **9**(4): 685-686.

Nečas, E. (2000). **Obecná patologická fyziologie.** Praha, Karolinum.

Neupert, W. a J. M. Herrmann (2007). **Translocation of proteins into mitochondria.** *Annu Rev Biochem* **76**: 723-749.

Oh-hama, T. (1997). **Evolutionary consideration on 5-aminolevulinate synthase in nature.** *Orig Life Evol Biosph* **27**(4): 405-412.

Palade, G. E. (1952). **The fine structure of mitochondria.** *Anat Rec* **114**(3): 427-451.

- Palade, G. E. (1953). **An electron microscope study of the mitochondrial structure.** *J Histochem Cytochem* **1**(4): 188-211.
- Petros, A. M., E. T. Olejniczak a S. W. Fesik (2004). **Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.** *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 83-94.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King a A. Strasser (1999). **The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.** *Mol Cell* **3**(3): 287-296.
- Reed, J. C. (1994). **Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.** *J Cell Biol* **124**(1-2): 1-6.
- Reed, J. C., T. Miyashita, S. Takayama, H. G. Wang, T. Sato, S. Krajewski, C. Aime-Sempe, S. Bodrug, S. Kitada a M. Hanada (1996). **BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy.** *J Cell Biochem* **60**(1): 23-32.
- Rossier, M. F. (2006). **T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria.** *Cell Calcium* **40**(2): 155-164.
- Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg a M. A. Venkatachalam (1999). **Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.** *Am J Med* **107**(5): 489-506.
- Seo, Y. W., J. N. Shin, K. H. Ko, J. H. Cha, J. Y. Park, B. R. Lee, C. W. Yun, Y. M. Kim, D. W. Seol, D. W. Kim, X. M. Yin a T. H. Kim (2003). **The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death.** *J Biol Chem* **278**(48): 48292-48299.
- Shimizu, S., F. Nomura, T. Tomonaga, M. Sunaga, M. Noda, M. Ebara a H. Saisho (2004). **Expression of poly(ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance.** *Oncol Rep* **12**(4): 821-825.
- Soda, G., A. Antonaci, D. Bosco, S. Nardoni a M. Melis (1999). **Expression of bcl-2, c-erbB-2, p53, and p21 (waf1-cip1) protein in thyroid carcinomas.** *J Exp Clin Cancer Res* **18**(3): 363-367.
- Staibano, S., S. Pepe, L. Lo Muzio, P. Somma, M. Mascolo, G. Argenziano, M. Scalvenzi, G. Salvatore, G. Fabbrocini, G. Molea, A. R. Bianco, C. Carlomagno a G. De Rosa (2005). **Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1 expression in malignant melanomas from photoexposed areas of the head and neck region.** *Hum Pathol* **36**(7): 724-731.
- Stoimenova, M., A. U. Igamberdiev, K. J. Gupta a R. D. Hill (2007). **Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria.** *Planta* **226**(2): 465-474.
- Suen, D. F., K. L. Norris a R. J. Youle (2008). **Mitochondrial dynamics and apoptosis.** *Genes Dev* **22**(12): 1577-1590.
- Taskin, M., T. A. Lallas, H. R. Barber a M. M. Shevchuk (1997). **bcl-2 and p53 in endometrial adenocarcinoma.** *Mod Pathol* **10**(7): 728-734.
- Taylor, S. W., E. Fahy, B. Zhang, G. M. Glenn, D. E. Warnock, S. Wiley, A. N. Murphy, S. P. Gaucher, R. A. Capaldi, B. W. Gibson a S. S. Ghosh (2003). **Characterization of the human heart mitochondrial proteome.** *Nat Biotechnol* **21**(3): 281-286.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J. N. Spelbrink, A. T. Rovio, C. E. Bruder, Y. M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H. T. Jacobs a N. G. Larsson (2004). **Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase.** *Nature* **429**(6990): 417-423.

- Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe a C. M. Croce (1985). **Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.** *Science* **228**(4706): 1440-1443.
- Vande Velde, C., J. Cizeau, D. Dubik, J. Alimonti, T. Brown, S. Israels, R. Hakem a A. H. Greenberg (2000). **BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore.** *Mol Cell Biol* **20**(15): 5454-5468.
- von Ahsen, O., C. Renken, G. Perkins, R. M. Kluck, E. Bossy-Wetzel a D. D. Newmeyer (2000). **Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release.** *J Cell Biol* **150**(5): 1027-1036.
- Wajant, H. (2003). **Death receptors.** *Essays Biochem* **39**: 53-71.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier a P. Scheurich (2003). **Tumor necrosis factor signaling.** *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.
- Wallace, D. C. (2005). **A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine.** *Annu Rev Genet* **39**: 359-407.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo a A. S. Baldwin, Jr. (1996a). **TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB.** *Science* **274**(5288): 784-787.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel a A. S. Baldwin, Jr. (1998). **NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.** *Science* **281**(5383): 1680-1683.
- Wang, K., X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman a S. J. Korsmeyer (1996b). **BID: a novel BH3 domain-only death agonist.** *Genes Dev* **10**(22): 2859-2869.
- Wyllie, A. H. (1987). **Apoptosis: cell death in tissue regulation.** *J Pathol* **153**(4): 313-316.
- Yang, Y. L. a X. M. Li (2000). **The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities.** *Cell Res* **10**(3): 169-177.
- Yin, X. M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth a S. J. Korsmeyer (1999). **Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis.** *Nature* **400**(6747): 886-891.
- Zhang, J., X. Li, M. Mueller, Y. Wang, C. Zong, N. Deng, T. M. Vondriska, D. A. Liem, J. I. Yang, P. Korge, H. Honda, J. N. Weiss, R. Apweiler a P. Ping (2008). **Systematic characterization of the murine mitochondrial proteome using functionally validated cardiac mitochondria.** *Proteomics* **8**(8): 1564-1575.
- Zick, M., R. Rabl a A. S. Reichert (2009). **Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria.** *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 5-19.