

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lenka Rajsiglová**

Cytochrom c a jeho úloha v apoptóze

Cytochrome c and its role in apoptosis

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martin Kalous, CSc.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.05.2012

Podpis

## Abstrakt

Energetický metabolismus a zajišťování životaschopnosti buňky jsou procesy přísně kontrolované dráhami, ve kterých mají centrální úlohu cytochromy, především cytochrom c. Nachází se v mezimembránovém prostoru mitochondrií spolu s dalšími molekulami, se kterými spolupracuje na udržování energetického metabolismu. Permeabilizace vnější mitochondriální membrány, prováděná proteiny Bcl-2 rodiny nebo změnami v koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$ , způsobuje uvolnění cytochromu c do cytosolu. V cytosolu cytochrom c interaguje s dalšími pro-apoptotickými proteiny (Apaf-1, prokaspáza-9) kooperujícími na tvorbě apoptosomu a fosfatidylserinem. Následkem těchto interakcí buňka podstupuje apoptózu.

Tato bakalářská práce shrnuje současné znalosti těchto procesů. V první části se zaměřuje na biosyntézu cytochromu c, dále pak na mechanismy jeho uvolňování z mitochondrií a interakce s dalšími proteiny v rámci apoptózy včetně možností regulace těchto procesů.

**Klíčová slova:** cytochrom c, apoptóza, apoptosom, Apaf-1, kaspázy, Bcl-2 proteiny, VDAC, kardiolipin

## **Abstract**

Cell energetic metabolism and cell survival are strictly controlled by pathways in which cytochrome molecules play a central role, in particular cytochrome c. It is localized in the mitochondrial intermembrane space with other molecules cooperating in keeping energetic metabolism. Permeabilization of outer mitochondrial membrane by proteins from Bcl-2 family or changes in  $\text{Ca}^{2+}$  levels causes cytochrome c release into cytosol. In cytosol cytochrome c interacts with other pro-apoptotic proteins (Apaf-1, procaspase-9) cooperating to form apoptosome and phosphatidylserine. As a result of these interactions, the cell is going to apoptosis.

This bachelor thesis summarizes the current state of knowledge of these processes. In the first part it focuses on the biosynthesis of cytochrome c, further on the mechanisms of its releasing from mitochondria and its interactions with other proteins within apoptosis including options of regulation of these processes.

**Keywords:** cytochrome c, apoptosis, apoptosome, Apaf-1, caspases, Bcl-2 proteins, VDAC, cardiolipin

# Obsah

Seznam zkratk.....	7
1. Úvod.....	8
2. Cytochrom c.....	9
2.1. Struktura a stavba.....	9
2.2. Výskyt v buňce.....	10
2.3. Biogeneze.....	10
2.4. Funkce v buňce.....	12
2.4.1. Přenašeč elektronu.....	12
2.4.2. Peroxidázová aktivita.....	13
2.4.3. Antioxidační aktivita.....	13
2.4.4. Aktivita v apoptóze.....	14
3. Apoptóza.....	15
3.1. Kaspázy.....	15
3.2. Vnější dráha.....	15
3.3. Vnitřní dráha.....	16
3.4. Exekuční fáze.....	17
3.5. Propojení vnitřní a vnější apoptotické dráhy.....	18
4. Role cytochromu c v apoptóze.....	19
4.1. Interakce s lipidy.....	19
4.2. Vylití z mitochondrie.....	19
4.2.1. Signály vedoucí k vylití.....	20
4.2.2. mPTP.....	21
4.2.3. Bcl2 proteiny.....	22
4.2.3.1. Bax, Bak.....	22
4.2.3.2. Bcl-xL.....	23
4.2.3.3. BH3-only.....	23

4.2.4.	VDAC.....	23
4.3.	Interakce s Apaf-1 .....	24
4.3.1.	Sestavení apoptosomu .....	25
4.3.2.	Aktivace prokaspáz-9 .....	26
4.3.3.	Regulace tvorby apoptosomu pomocí redox stavu Fe v hemu.....	26
4.3.4.	Regulace pomocí iontů.....	27
4.3.5.	Regulace pomocí nukleotidů.....	28
4.3.6.	Regulace pomocí apocytochromu c .....	28
4.4.	Další funkce cytochromu c v apoptóze– externalizace PS.....	29
5.	Závěr.....	30
	Seznam literatury .....	31

## Seznam zkratek

ADP/dADP	(deoxy)adenosindifosfát
AIF	apoptosis inducing factor
ANT	adenin nukleotide translocase
ATP/ dATP	(deoxy)adenosintrifosfát
CARD	caspase recruitment domain
CCHL	cytochrome c haem lyase
CD	cluster of diferenciation
CyP-D	cyclophilin-D
DED	death effector domain
DISC	death inducing signalling complex
DRP-1	dynamamin related protein
ER	endoplasmatické retikulum
FADD	Fas associated death domain
Fe	železo
GIP	general import pore
IAP	inhibitor of apoptosis protein
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
RHS/ROS	reactive halogen/ oxygen species
TNF	tumor necrosis factor
TOM	translocase of the outer mitochondrial membrane
VDAC	voltage-dependent anion channel
WD	aminokyselinový motiv, tyrozin-aspartová kyselina

## 1. Úvod

Mitochondrie tvoří nepostradatelnou součást eukaryotických buněk a vyskytují se téměř ve všech jejich typech. Primární funkcí mitochondrie je tvorba dostatečného množství ATP v elektrontransportním řetězci a tím zajišťuje energetické zásobování buňky (Bernard a Azzone, 1981). Kromě této základní funkce plní také řadu jiných. Probíhají zde procesy jako například část cyklu močoviny, Krebsův cyklus, syntéza různých skupin hemových molekul a dalších kofaktorů, ale také aminokyselin nebo Fe-S proteinů. První náznaky, že se mitochondrie podílí na apoptotické buněčné smrti, se objevily začátkem 90. let minulého století (Hockenberry *et al.*, 1990). Jen o několik let později byla objevena důležitá úloha cytochromu c v apoptóze (Liu *et al.*, 1996).

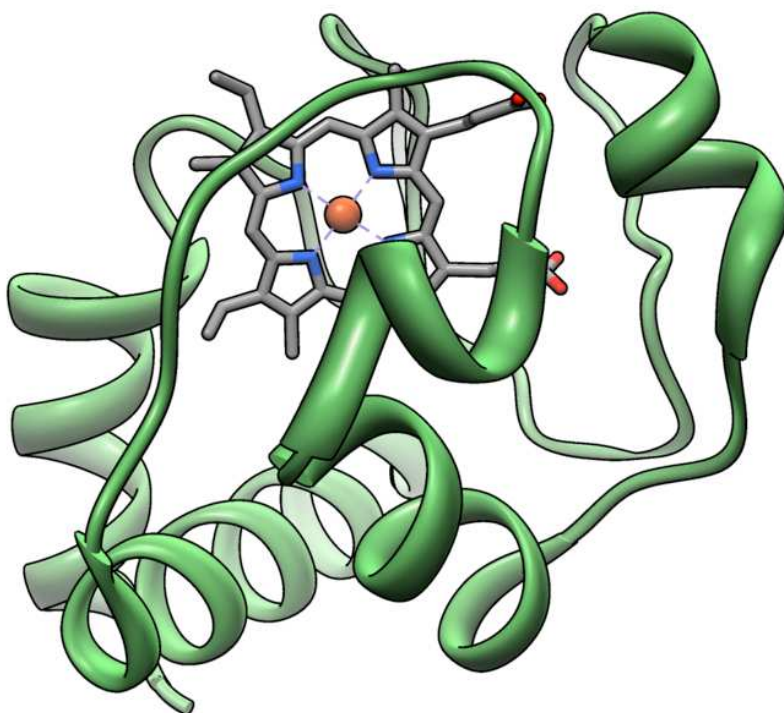
Nepostradatelnou úlohu v elektrontransportním řetězci mají proteiny cytochromové rodiny *a*, *b* a *c*. Jedná se o hemoproteiny, jejichž hlavní úlohou je přenášení elektronů uvnitř komplexů řetězce, jichž jsou součástí, i mezi nimi. Zajišťují tím v mitochondrii energetický metabolismus. Přenos mezi jednotlivými komplexy zajišťují koenzym Q a cytochrom c.

Cytochrom c tak představuje životně důležitou molekulu, která má nezastupitelnou úlohu při zajišťování energetického metabolismu stejně jako v regulaci buněčného života. Jak se cytochrom c podílí na těchto procesech a způsob jejich regulace, je tématem této bakalářské práce.



## 2. Cytochrom c

Cytochrom c je malý solubilní protein o molekulové hmotnosti kolem 12,5 kDa a je členem cytochromové rodiny. Tato proteinová rodina se skládá z proteinové části a hemové skupiny. Proteinová část cytochromu c u obratlovců obsahuje 103 nebo 104 aminokyselinových zbytků (Obr. 1). V buňce se vyskytuje ve dvou redoxních stavech, jako redukovaný ferrocytochrom c nebo oxidovaná forma ferricytochrom c (Brown a Borutaite, 2008).



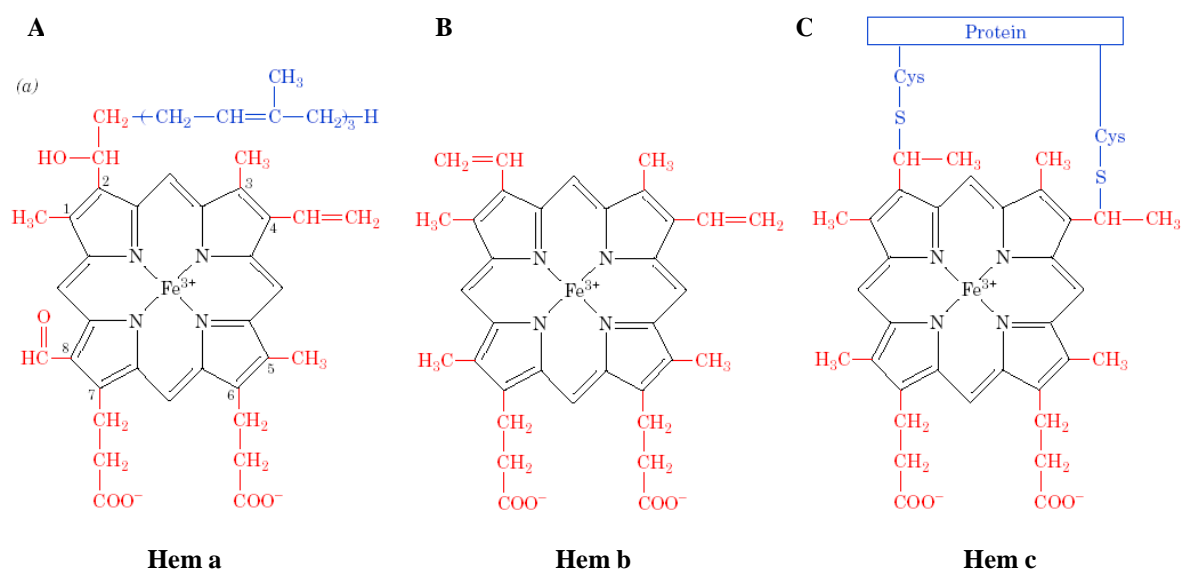
**Obrázek 1: Cytochrom c, převzato z: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cytochrome\\_C.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cytochrome_C.png)**

Molekula cytochromu c obsahující proteinovou část (zeleně), hemovou prostetickou skupinu (šedě) s koordinačně navázaným atomem železa (červeně)

### 2.1. Struktura a stavba

Cytochromy jsou proteiny skládající se z proteinové a hemové části, která obsahuje koordinačně navázaný atom železa. Díky železu, jež má schopnost přecházet mezi oxidačními stavy  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , se cytochromy podílí především na přenosu elektronů v elektrontransportním řetězci. V mitochondriích se vyskytují tři druhy cytochromů, a to cytochromy *a*, *b* a *c*. Hlavním rozdílem mezi jednotlivými rodinami cytochromů jsou rozdílné struktury jejich hemových prostetických skupin (Obr. 2). Základ hemu typu *c* tvoří

protoporfyrinový kruh, který má na vinylové skupiny navíc navázané thiolové skupiny cysteinu proteinové části.



**Obrázek 2: Porovnání struktury jednotlivých rodin hemových skupin, převzato z: Voet, Voetová, 2011, 4. vydání**

- A) Hemová skupina typu a s dlouhým hydrofobním řetězcem izoprenových jednotek a formylovou skupinou.
- B) Hemová skupina typu b je tvořena protoporfyrinem IX.
- C) Hemová skupina typu c propojená thioesterovými vazbami s proteinem.

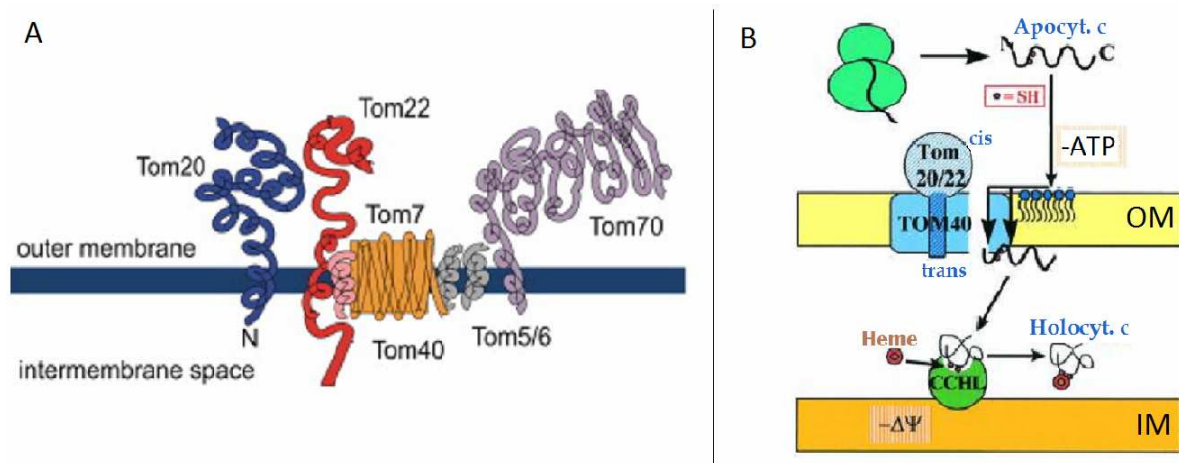
## 2.2. Výskyt v buňce

Za fyziologických podmínek je cytochrom c lokalizován v mezimembránovém prostoru mitochondrie. (Mayer *et al.*, 1995). Může se nacházet volně pohyblivý nebo vázaný na vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány (Bernard a Azzone, 1981). Na membránu je navázán pomocí slabých vazebných interakcí s lipidy, převážně kardiolipinem, které ho kotví k membráně (Ott *et al.*, 2001).

## 2.3. Biogeneze

Ačkoliv je konečným místem působení cytochromu c mitochondrie, protein je kódovaný jaderně. Jeho syntéza probíhá na volných cytosolických ribosomech. Po translaci vzniká prekurzor apocytochrom c. Z cytosolu musí být proto následně traslokován a importován dovnitř mitochondrie a během importu mu je přidána hemová molekula. Tím vzniká holoenzym cytochrom c, který může plnit svou funkci (Mayer *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2004). Import apocytochromu c se liší u různých skupin organismů, jako jsou

G-bakterie, rostliny, houby, řasy, kvasinky nebo živočichové. Existují 3 základní systémy biogeneze cytochromu c. Živočišnému modelu je velmi blízký model kvasinkový, na kterém bylo provedeno několik experimentů (Kranz *et al.*, 2009). Apocytochrom c nemá odštěpitelnou N-terminální presekvenci, jeho transport do mitochondrie se proto liší od klasického transportu proteinů obsahujících tuto sekvenci (Mayer *et al.*, 1995). Přesto ale využívá některých proteinů klasického importního systému. Úzce souvisí s proteinem Tom40, který vytváří GIP (general import pore). Nevyužívá ale povrchových částí komplexu TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane). GIP je  $\beta$ -barelový pór ve vnější mitochondriální membráně tvořící kanál propustný pro proteiny. Je tvořen proteiny Tom40, se kterými jsou asociované Tom22 a malé proteiny Tom6 a 7. Tom22 funguje jako receptor, ale také se podílí na translokaci proteinů. Malé proteiny Tom6 a 7 zajišťují stabilitu tohoto komplexu (Obr. 3). Za fyziologických podmínek vznikají nejčastěji struktury se dvěma kanály (Ahting *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 2008).



**Obrázek 3: Topologie a struktura TOM komplexu, převzato z Perry *et al.* 2008 a Diekert *et al.* 2001**

- A) Každý TOM komplex se skládá z  $\beta$ -barelového póru tvořeného proteiny Tom40 a dalších transmembránových podjednotek, které jsou s Tom40 asociovány
- B) Translokace apocytochromu c do mezimembránového prostoru mitochondrie, kde je mu přidána hemová prostetická skupina (viz. text níže)

Apocytochrom c po nasyntetizování v cytosolu interaguje se záporně nabitými fosfolipidy na povrchu mitochondrie a zanořuje se do membrány. Tyto interakce se zdají být stabilizovány specifickými interakcemi apocytochromu c s TOM komplexem. TOM komplex zprostředkovává protažení proteinu přes membránu zajištěním vazebného místa pro apocytochrom c v kanálu. Toto vazebné místo je tvořeno převážně proteiny Tom40, ale nezdá se být identické s místem pro translokaci klasických proteinů s presekvencí. Jádro

TOM komplexu se nejčastěji skládá ze dvou kanálů, které slouží k translokaci preproteinů. Je možné, že právě jeden z těchto kanálů by mohl mít roli v translokaci apocytochromu c do mitochondrie. Na transportu apocytochromu c do mezimembránového prostoru mitochondrie se jako tzv. trans-side receptor podílí CCHL (cytochrome c haem lyase). CCHL je lokalizovaná na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány. Interakce CCHL s apocytochromem c usnadňuje jeho transport přes vnější mitochondriální membránu. Takto vzniklý komplex proteinů je stabilní a umožňuje dokončení translokace apocytochromu c do mitochondrie. Celý proces translokace je ireversibilně zakončen kovalentním navázáním hemové prostetické skupiny pomocí CCHL na apocytochrom c. Po navázání hemu se holoenzym sbalí do nativní konformace a může se oddisociovat od CCHL. Takto vzniklý holocytochrom c zůstane uvnitř mitochondrie a může vykonávat svou funkci (Diekert *et al.*, 2001) (Obr. 3).

Kovalentní navázání hemové molekuly na apocytochrom c je katalyzováno CCHL. Probíhá přes SH skupiny cysteinů 14 a 17. Při tomto procesu také dochází k navázání redukovaného železného iontu do komplexu (Mayer *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1972).

## **2.4. Funkce v buňce**

Cytochrom c se v buňce vyskytuje v různých stavech. Může být solubilní v mezimembránovém prostoru a volně nebo těsně asociovaný s vnější stranou vnitřní mitochondriální membrány. V buňce plní několik nezastupitelných a pro buňku životně důležitých funkcí. Jedná se především o přenášení elektronů v elektrontransportním řetězci, antioxidační aktivitu, peroxidázovou aktivitu a jeho podíl na spouštění apoptózy.

### **2.4.1. Přenašeč elektronu**

Cytochrom c se v mitochondriích vyskytuje ve vysokých koncentracích. Tím má téměř ideální předpoklady pro jeho fungování v elektrontransportním řetězci. Střídavě se váže na komplexy III a IV řetězce (cytochrom bc<sub>1</sub> a cytochrom oxidáza) a přenáší mezi nimi elektrony, čímž zajišťuje nepřetržitý energetický metabolismus buňky. Jeho funkce jako přenašeče elektronů spočívá v přijetí 1 elektronu od cytochromu c<sub>1</sub> komplexu III a jeho přenesení na komplex IV. Přijetí elektronu od cytochromu c<sub>1</sub> probíhá pomocí svedení elektronu do hemové části molekuly, kde dojde k redukci železa na Fe<sup>2+</sup>. Pro svedení elektronu do hemové molekuly není nutný její přímý kontakt s donorem elektronu. Tuto funkci zajišťuje membránově vázaná forma cytochromu c (Theorell a Akesson, 1941).

Cytochrom c ale nepřenáší elektrony jenom v rámci vnitřní mitochondriální membrány mezi komplexy III a IV. Zajišťuje také přenos elektronů mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Přenáší elektrony také z cytochromu b<sub>5</sub> NADH-cytochrom c reduktázy, která se nachází na vnější membráně, na cytochrom c oxidázu na vnitřní membráně. Tento přenos probíhá obdobně jako přenos mezi komplexy III a IV, pouze s tím rozdílem, že tento přenos zajišťuje volný cytochrom c (Bernard a Azzone, 1981).

#### **2.4.2. Peroxidázová aktivita**

Další z funkcí cytochromu c je schopnost katalýzy peroxidázových reakcí. Peroxidázová aktivita volného cytochromu c je velice nízká (Theorell a Akesson, 1941). K tomu aby bylo možné peroxidázovou aktivitu cytochromu c zvýšit, nejdříve potřebuje být konvertován na cytochrom c peroxidázu. Podstatou této konverze je oxidace cytochromu c, která může být indukovaná různými oxidačními činidly. K oxidaci dochází na pozici methioninu-80. Oxidace methioninu-80 vyruší jeho koordinační vazbu s železem hemové skupiny a cytochrom c tak ztratí svůj hexa-koordinační stav. Tuto oxidaci způsobují např: halogenové radikály nebo kardiolipin (Chen *et al.*, 2002). Velká část cytochromu c je volná nebo volně vázaná na vnější stranu vnitřní mitochondriální membrány. Jedná se o elektrostatické interakce a tyto formy cytochromu c nemají peroxidázovou aktivitu. Mezi cytochromem c a kardiolipinem existují silné elektrostatické a hydrofobní interakce, ty umožňují částečné rozbalení cytochromu c a aktivují jeho peroxidázovou aktivitu (Kagan *et al.*, 2005). Oxidace cytochromu c vede nejen ke zvýšení peroxidázové aktivity proteinu, ale i ke zvýšení jeho afinity ke kyslíkovým radikálům (Chen *et al.*, 2002).

#### **2.4.3. Antioxidační aktivita**

Nezanedbatelnou roli pro buňku má i antioxidační aktivita cytochromu c. Stejně jako funkce akceptoru/donoru elektronu v elektrontransportním řetězci, je i antioxidační aktivita realizována pomocí svedení elektronu do hemové prostetické skupiny, kde také dochází k redukci železného iontu z  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  (Theorell a Akesson, 1941). Antioxidační aktivitu vykazuje pouze volný, tedy nevázaný, cytochrom c, který je schopen převést superoxidový radikál  $O_2^{\cdot-}$  zpět na  $O_2$ . Při tomto procesu je cytochrom c redukován a může být posléze reoxidován komplexem IV elektrontransportního řetězce (Korshunov *et al.*, 1998).

#### **2.4.4. Aktivita v apoptóze**

Poslední funkcí cytochromu c, které je pro buňku životně důležitá, je spouštění apoptotické dráhy. Po aktivaci pro-apoptotických signálů dochází k vylití cytochromu c do cytosolu (Ott *et al.*, 2001). Zde interaguje s Apaf-1 a prokaspázami-9 a vytváří apoptosom, čímž aktivuje kaspázovou kaskádu (Kim *et al.*, 2005). Jeho dalším partnerem je PS (fosfatidylserin). Cytochrom c katalyzuje jeho oxidaci a externalizaci na vnější stranu plasmatické membrány, kde funguje jako tzv. eat me signál (Jiang *et al.*, 2003).

### 3. Apoptóza

Apoptóza představuje jednu z forem programované buněčné smrti. Jedná se o evolučně konzervovanou formou buněčné smrti a hraje klíčovou roli v regulaci mnoha buněčných dějů. Je velmi přísně regulována pomocí interakcí různých pro-apoptotických i anti-apoptotických genů a proteinů. Typické je pro ni spuštění kaspázové kaskády. Podílí se na vývoji orgánů v ontogenetickém vývoji i udržování homeostázy mnohobuněčných organismů. Apoptóza také zajišťuje odstranění starých, poškozených nebo infikovaných buněk. Do dnešní doby byly objeveny dvě hlavní cesty apoptózy – vnitřní dráha a vnější dráha.

#### 3.1. Kaspázy

Na procesu apoptózy se podílejí dva druhy kaspáz, a to iniciátorové (kaspázy 2, 8, 9 a 10) a efektorové (kaspázy 3, 6 a 7). Jedná se o cysteinové proteázy, které obsahují ve svém aktivním místě cystein a substrát štěpí za aspartátem, odtud pochází i jejich název. Pro iniciátorové kaspázy je, v porovnání s efektorovými, charakteristická delší N-terminální prodoména. Všechny kaspázy jsou v buňkách syntetizovány jako katalyticky neaktivní zymogeny a v průběhu apoptózy musí být aktivovány. Existuje několik způsobů, jakými může aktivace probíhat. Iniciátorové kaspázy jsou aktivovány autokatalyticky, jelikož mají vnitřní proteolytickou aktivitu, celý proces tak musí být přísně regulován, např. vyžadovat utvoření apoptosomu u kaspázy 9 aj. Takto aktivované iniciátorové kaspázy poté v buňce spouští kaskádu efektorových kaspáz, které aktivují proteolytickým naštěpením (Shi, 2002).

#### 3.2. Vnější dráha

Vnější apoptotická dráha je aktivována pomocí ligandů, které interagují s povrchovými receptory buněk určených k odstranění.

Mezi tyto proteiny patří především receptory TNF (tumor necrosis factor) jako je Fas, jehož ligandem je FasL, nebo CD40 s ligandem CD40L. Tyto molekuly obsahují na cytoplasmatické straně tzv. death doménu. Jedná se o konzervovaný motiv, který slouží k následnému propojení receptorů s dalšími molekulami. Navázání FasL na Fas způsobí multimerizaci receptorů a navázání dalších proteinů. S cytoplasmatickou death doménou receptoru Fas interaguje FADD (Fas associated death domain) svou vlastní death doménou (Parijs a Abbas, 1996).

Důležitým krokem v indukci vnější apoptotické dráhy je vytvoření komplexu DISC (death inducing signalling complex). V DISC komplexu se nachází cytosolické domény Fas receptorů, adaptorové proteiny FADD a prokaspázy-8. Po přiblížení se ke komplexu Fas/FADD interagují prokaspázy-8 s FADD pomocí DED (death effector domain), které se nachází jak u FADD, tak u prokaspáz. Vzniklý DISC komplex umožní autokatalytické naštěpení prokaspázy-8 a vznikne proteolyticky aktivní kaspáza-8. Jedná se o tzv. model indukovaného přiblížení. Kaspáza-8 následně aktivuje efektorové kaspázy (Muzio *et al.*, 1998). Podle novějšího modelu spolu prokaspázy-8 asociují a vytváří prokaspázové dimery. Tyto dimery už jsou proteolyticky aktivní a jsou schopné se štěpit navzájem. Během jejich aktivace současně dochází ke změně jejich substrátové specifity. To znamená, že prekurzorový dimer specificky rozpoznává jiné prekurzorové dimery, zatímco dimery aktivní kaspázy-8 rozpoznávají prekurzory efektorových kaspáz (Chang, 2003).

### 3.3. Vnitřní dráha

Vnitřní apoptotická dráha, jak vyplývá z jejího názvu, je spouštěna zevnitř buňky. K její aktivaci dochází v případě, že vnější mitochondriální membrána ztratí svou integritu a pro-apoptotické proteiny, které byly lokalizovány uvnitř mitochondrie se uvolní do cytosolu. Permeabilitu vnější mitochondriální membrány ovlivňují značnou měrou proteiny savčí rodiny Bcl-2 (Sheridan *et al.*, 2008)

Vnitřní apoptotická kaskáda je také důsledně regulovaný proces. Sestává se z několika důležitých, po sobě následujících, kroků. Nejdříve dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, na kterém se významně podílí proteiny rodiny Bcl-2 a VDAC (Keinan *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009). Následně dochází k uvolnění pro-apoptotických molekul, především cytochromu c, do cytosolu. V důsledku toho může za vhodných podmínek dojít k sestavení apoptosomu a tím aktivaci prokaspáz-9 (Kim *et al.*, 2005; Acehan *et al.*, 2002). Kroky, ve kterých má úlohu cytochrom c, budou rozebrány podrobněji ve druhé části. Uvolňují se i další pro-apoptotické proteiny, které svými interakcemi umožňují aktivaci kaspáz.

AIF je pro-apoptotický protein, který se řadí mezi flavoproteiny. Jedná se o jaderně kódovaný protein s mitochondriální lokalizační sekvencí na N-konci. Za normálních podmínek se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií, odkud se uvolňuje až během apoptózy spolu s cytochromem c a dalšími proteiny jako Smac/Diablo. Uvnitř mitochondrií působí za fyziologických podmínek jako NADH/FADH<sub>2</sub> oxidáza. Po vylití



z mitochondrií do cytosolu se transportuje do jádra, kde způsobuje kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA. Podílí se na části apoptózy, která je nezávislá na kaspázách. AIF se z mitochondrií může uvolňovat i spontánně, stejně jako cytochrom c, ale toto uvolňování je zpomalováno pomocí Bcl-2 anti-apoptotických proteinů (Loeffler *et al.*, 2001). K vylití AIF z mitochondrií dochází ještě krátce před cytochromem c. To může být způsobeno tím, že cytochrom c se v mitochondriích nachází jak volný tak i vázaný na vnitřní membránu. AIF se nachází v mezimembránovém prostoru pouze volný a může být uvolněn bez časové prodlevy (Daugas *et al.*, 2000). Svým uvolněním AIF napomáhá také plnému vylití cytochromu c do cytosolu. Jakmile se v cytosolu jednou objeví, pozitivně ovlivňuje uvolňování dalších mitochondriálních proteinů a podporuje permeabilizaci vnější membrány. Vytváří tak určitou pozitivní zpětnou vazbu (Loeffler *et al.*, 2001).

### **3.4. Exekuční fáze**

Exekuční fáze apoptózy spočívá v aktivaci efektorových kaspáz, především kaspáz 3 a 7. Kaspáza 3 se za fyziologických podmínek vyskytuje ve formě katalyticky neaktivního zymogenu. Aby byla katalyticky aktivní, musí být proteolyticky naštěpena. Toto naštěpení zajišťují iniciátorové kaspázy 8 a 9. Aktivace probíhá proteolytickým odštěpením prodomény, které způsobí prostorové přeskupení smyček v katalyticky aktivním místě kaspázy (Park *et al.*, 2004). Cílové substráty pro efektorové kaspázy jsou primárně proteiny účastnící se na procesech reparace DNA nebo komponenty cytoskeletu a jaderného obalu (Grütter, 2000). Aktivace kaspáz je regulována interakcemi s pro- i anti-apoptotickými proteiny.

XIAP, člen anti-apoptotické IAP (inhibitor of apoptosis protein) proteinové rodiny, se vyskytuje pouze u živočichů. Váže se na iniciátorové kaspázy 9 a efektorové kaspázy 3 a 7. Pokud se na aktivní kaspázy 3, 7 a 9 naváže XIAP, tak svou interakcí brání navázání substrátu do aktivního místa kaspázy (Deveraux *et al.*, 1998; Riedl *et al.*, 2001; Chai *et al.*, 2001).

Smac/Diablo je pro-apoptotický protein uvolňovaný z mitochondrií. Protein Smac/Diablo tvoří ve fyziologických podmínkách homodimery (Flanagan *et al.*, 2011). Jejich hlavní úlohou v regulaci apoptózy je rušení inhibice kaspáz pomocí XIAP. Inhibici kaspáz pomocí XIAP ruší vyvázáním tohoto anti-apoptotického proteinu z komplexu s kaspázou (Gao *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2000).

### **3.5. Propojení vnitřní a vnější apoptotické dráhy**

BH3-only protein tBid (truncated Bid) představuje propojení mezi vnější apoptotickou dráhou aktivovanou death receptory a vnitřní dráhou, která je zprostředkována mitochondriemi. Bid je štěpen mimo jiné také kaspázou-8, která je aktivována přes Fas/TNF1 receptory. tBid následně interaguje s Bax a Bak, čímž způsobuje vylití pro-apoptotických proteinů do cytosolu (Perez *et al.*, 2011).

## 4. Role cytochromu c v apoptóze

### 4.1. Interakce s lipidy

Cytochrom c se v mezimembránovém prostoru nachází volný a volně nebo těsně navázaný na kardiolipin vnitřní mitochondriální membrány (Kagan *et al.*, 2005).

Kardiolipin patří mezi glycerofosfolipidy. Vyznačuje se unikátní dimerní strukturou, která je propojena glycerolovou molekulou. Má navázaný 4 zbytky mastných kyselin a dva záporné fosfátové náboje. Vyskytuje se výhradně v bakteriálních a mitochondriálních membránách. Jeho název je odvozen od toho, že byl nejprve izolován ze srdečních buněk, kde vyskytuje ve vysoké koncentraci. Díky své struktuře má kardiolipin možnost interagovat s širokou škálou navzájem nepříbuzných proteinů. V mitochondriích interaguje například s proteiny elektrontransportního řetězce. Jedním z těchto mitochondriálních proteinů je také cytochrom c. Jejich vzájemná interakce způsobí změnu konformace jak v kardiolipinu tak i v cytochromu c (Schlame *et al.*, 2010). Volné navázání je zprostředkováno elektrostatickými interakcemi mezi kladně nabitými lysinovými zbytky cytochromu c a záporně nabitými fosfátovými skupinami kardiolipinu. Těsné navázání vyžaduje kromě elektrostatických interakcí také hydrofobní interakce (Kagan *et al.*, 2005).

### 4.2. Vylití z mitochondrie

Jak už bylo výše uvedeno, cytochrom c se v mitochondrii nachází v několika stavech: může být volný v mezimembránovém prostoru a volně nebo těsně vázaný na vnitřní mitochondriální membránu. Proces uvolnění cytochromu c z mitochondrií proto probíhá ve dvou krocích. Aby se mohl z mitochondrií vylít musí být nejdříve v prvním kroku uvolněn z vnitřní membrány. Poté se může oddisociovat od membrány a následně uvolnit do cytosolu (Ott *et al.*, 2001).

Kyslíkové radikály, iontové složení prostředí a další faktory mohou měnit nebo rušit elektrostatické interakce mezi cytochromem c a lipidem vnitřní mitochondriální membrány. Tím umožňují uvolnění cytochromu c od tohoto lipidu (Ott *et al.*, 2001). K narušení interakce mezi cytochromem c a kardiolipinem dochází při oxidaci kardiolipinu. Teprve poté, co je cytochrom c uvolněn od lipidu se může vylít díky permeabilizaci membrány (Jiang *et al.*, 2008).

Cytochrom c a další pro-apoptické proteiny jsou z mitochondrií uvolňovány několika různými způsoby, které mohou být vzájemně propojené a regulovatelné. Samotné vylití cytochromu c do cytosolu probíhá během několika málo sekund v rámci 1 mitochondrie. V rámci celé buňky podstupující apoptózu se jedná o několik málo minut. Podle pokusů, které provedl Ripple *et al.* se zdá, že se cytochrom c může i po svém uvolnění do cytosolu vrátet zpět do mezimembránového prostoru mitochondrie přes póry permeabilní vnější membrány, jimiž je uvolňován ven. (Ripple *et al.*, 2010).

#### 4.2.1. Signály vedoucí k vylití cytochromu c

K permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c dochází pod vlivem mnoha faktorů.

Poškození DNA, ale i jiné stresové stimulace jako třeba aktivace onkogenů stimulují aktivaci proteinu p53. Pokud dojde vlivem stresových faktorů k jeho nahromadění v cytosolu, aktivuje pro-apoptické proteiny Bax a Bak. Navázání p53 na Bak katalyzuje jeho aktivaci tím, že stimuluje jeho uvolnění od inhibičního Bcl-2 proteinu, čímž se spouští jeho oligomerizace a permeabilizace membrány. p53 také indukuje expresi BH3-only proteinů Noxa, Puma nebo Bik. Noxa a Puma dále interagují s Bcl-2 proteiny a umožňují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (Nakano a Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000). Bik indukuje vylití  $\text{Ca}^{2+}$  zásob z ER (Maithai *et al.*, 2005).

$\text{Ca}^{2+}$  je velmi důležitý druhý posel, který ovlivňuje mnoho procesů v buňce, včetně apoptózy.  $\text{Ca}^{2+}$  se nachází uskladněný především v ER odkud se může dostávat do mitochondrií. Na regulaci množství  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu a ER se podílí několik proteinů. Jeho transport z cytosolu do ER zajišťuje ATPáza SERCA a na uvolňování z ER se podílí IP3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) a RyR (ryanodine receptor). Uvolněný  $\text{Ca}^{2+}$  vstupuje do mitochondrií. Tento transport je zprostředkovaný mitochondriálním  $\text{Ca}^{2+}$  uniporterem a uvolnění se děje pomocí  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku (Gogvadze a Orrenius, 2006). Při jeho nahromadění v mitochondrii spouští apoptotickou dráhu, která se zdá být nezávislá na Bax/Bak proteinech lokalizovaných v mitochondriích. Mechanismus, jakým  $\text{Ca}^{2+}$  spouští apoptózu dosud není zcela známý (Scorrano *et al.*, 2003). Je možné, že na něm nějakým způsobem podílí DRP1 (dynamamin related protein), který fragmentuje vnější mitochondriální membránu. (Mathai *et al.*, 2005).

tBid je zkrácenou formou BH3-only proteinu Bid. K jeho zkrácení může dojít různými způsoby. Může být štěpen kaspázou-8 při aktivaci vnější mitochondriální dráhy přes Fas/TNFR1 nebo také jako odpověď na vnitřní stresové faktory buňky. tBid následně interaguje s Bax a Bak a způsobuje vylití cytochromu c z mitochondrie. Další jeho důležitou funkcí je podpora produkce mitochondriálních ROS, které podporuje oligomerizaci proteinů Bak. Permeabilizace membrány, se v tomto případě šíří z několika ohnisek a ROS svým působením urychlují samotný proces permeabilizace, který probíhá jako vlna (Perez *et al.*, 2011).

#### 4.2.2. mPTP

Dříve se předpokládalo, že k uvolnění pro-apoptických proteinů dochází pomocí mitochondriálního póru měnícího propustnost membrány (mPTP), jehož otevření je indukováno zvýšenou koncentrací  $Ca^{2+}$  v matrix mitochondrií (Crompton, 1999). Otevření tohoto kanálu vede k permeabilizaci vnitřní mitochondriální membrány. Molekuly o malé molekulové hmotnosti, včetně iontů a kofaktorů, mohou procházet přes vnitřní mitochondriální membránu až do vyrovnání jejich parciálních osmotických tlaků. Jelikož mají proteiny větší molekulovou hmotnost, pórem procházet nemohou. Jejich koncentrace v matrix je větší než v mezimembránovém prostoru nebo cytosolu. Rozdíly v těchto koncentracích způsobí osmotický tlak, který vede k tomu, že matrix začne nabývat na objemu. To může vést až k roztržení vnější membrány (Halestrap, 2009).

Podle původních představ byl komplex tohoto mitochondriálního póru tvořen napěťově závislým aniontovým kanálem (VDAC), adenin nukleotidovým přenašečem (ANT) a cyklophilinem-D (CyP-D) v kontaktních místech mezi vnější a vnitřní membránou. (Crompton, 1999). Postupně se ukazuje, že tyto proteiny mPTP spíše regulují, než aby ho tvořily. Jaké proteiny mPTP tvoří, není zcela jasné (Rasola *et al.*, 2010).

Jestli se mPTP účastní apoptózy je předmětem diskusí. Pokusy, které provedl Nakagawa *et al.*, naznačují, že mPTP se účastní spíše nekrotické buněčné smrti, během které dochází k roztržení mitochondrií a ztrátě jejich funkce, než na apoptotické smrti, během které si mitochondrie svou strukturu zachovává (Nakagawana *et al.*, 2005).

### 4.2.3. Bcl2 proteiny

Do rodiny Bcl-2 (B-cell-lymphoma) patří proteiny podílející se na regulaci apoptózy. Jejich aktivita je jak pro-apoptotická – Bax, Bak, Bid, Bad a další, tak anti-apoptotická – Bcl-xL, Bcl-2 a další. Pro a anti-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 přímo ovlivňují přenos makromolekulárních látek přes vnější mitochondriální membránu (Kuwana *et al.*, 2002).

Obsahují jednu nebo více ze 4 konzervovaných domén BH1, BH2, BH3 a BH4 (Bcl-2 homologní domény). Anti-apoptotické proteiny obsahují všechny čtyři domény. Pro-apoptotické proteiny mohou být dále rozděleny na několik skupin. Efektorové proteiny Bax a Bak obsahují domény BH1, 2 a 3 a zajišťují samotnou permeabilizaci membrány. BH3-only proteiny, jak napovídá jejich název, obsahují jenom BH3 doménu a fungují jako tzv. aktivátory nebo senzitizery. Aktivátory jako Bim se váží přímo na Bax nebo Bak a spouští jejich oligomerizaci. Senzitizery jako Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) aktivují oligomerizaci nepřímo tím, že se váží na anti-apoptotické proteiny a tím je neutralizují. (Kim *et al.*, 2009).

#### 4.2.3.1. Bax, Bak

Jak již bylo uvedeno, Bax a Bak patří mezi pro-apoptotické proteiny, které po obdržení apoptotických signálů vytvářejí póry ve vnější mitochondriální membráně. Ty umožňují vylítí cytochromu c a dalších proteinů z mitochondrií. Bax je za normálních podmínek lokalizován v cytosolu nebo volně vázán na vnější membránu (Jourdain a Martinou, 2009). Bak se nachází na vnější mitochondriální membráně a na membráně ER. Díky své strukturní i funkční homologii mohou v apoptotické buňce Bax a Bak vytvářet homo- i hetero-oligomery. Pro svou pro-apoptotickou aktivitu a oligomerizaci potřebují BH3 domény (Wang *et al.*, 2009). Interakcí BH3-only proteinů s Bax dochází ke změně konformace a Bax se může zanořit do membrány (Eskes *et al.*, 1999). Následná oligomerizace je doprovázena dalšími konformačními změnami. Díky těmto konformačním změnám mohou nakonec Bax proteiny vytvořit ve vnější membráně pór pro cytochrom c a další proteiny (Antonsson *et al.*, 2000).

Změny vedoucí k integraci Bax do membrány a princip jeho oligomerizace podhalil ve svých pokusech Kim. K vytvoření póru pomocí Bax je zapotřebí dvou oddělených kroků. V prvním kroku dochází k interakci BH1-domény Bax s BH3-only aktivátorovým proteinem. V důsledku této interakce se odhalí C-terminální i N-terminální doména Bax. Obě tyto domény jsou důležité pro lokalizaci Bax na mitochondrii. N-terminální doména zajišťuje

zacílení Bax na mitochondriální membránu, C-terminální doména svým hydrofobním charakterem kotví Bax do membrány. BH3-only protein zůstává nadále navázaný na Bax a po zakotvení do membrány spouští oligomerizaci Bax. Tato oligomerizace je zprostředkována BH3-doménami Bax. V případě aktivace Bak je zapotřebí pouze druhý krok, jelikož Bak je již lokalizován na mitochondriální membráně (Kim *et al.*, 2009).

#### 4.2.3.2. Bcl-xL

Bcl-xL je anti-apoptotický protein. V buňce se vyskytuje jako monomer, homodimer a oligomer. Jeho homodimerní a oligomerní forma interaguje s pro-apoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny a inhibují jejich aktivitu, monomerní forma interaguje s cytochromem c. Tato interakce ale byla zatím prokázána pouze v *in vitro* podmínkách. Není tedy zřejmé jestli má tato interakce nějakou roli *in vivo* (Yadaiah *et al.*, 2007). Ve zdravé buňce se anti-apoptotické proteiny váží na BH3-motiv pro-apoptotických Bax/Bak a zabraňují tak jejich oligomerizaci a tvorbě pórů (Wang *et al.*, 2009; Kuwana *et al.*, 2002).

#### 4.2.3.3. BH3-only

BH3-only proteiny svými BH3 doménami aktivují oligomerizaci Bax/Bak přímo nebo nepřímo. Přímou aktivaci provádí BH3-only proteiny jako Bid, Bim, jedná se o aktivátory. Tyto proteiny mohou být inhibovány interakcí s Bcl-xL (Letai *et al.*, 2002; Walensky *et al.*, 2006). Druhou skupinu tvoří sensitizéry jako Bad, Bik, Noxa, Puma, které mohou aktivovat oligomerizaci komplexu pouze nepřímo. Kompetují o vazebné místo na Bcl-xL s aktivátory, tím je uvolňují z inhibice a umožní jim aktivovat oligomerizaci (Certo *et al.*, 2006; Walensky *et al.*, 2006). Bid funguje jako aktivátor pro Bax/Bak proteiny. Aktivované kaspázy-8 nebo enzymy reaguující na vnitřní stresové podněty ho mohou naštěpit a vznikne jeho zkrácená verze tBid (Perez *et al.*, 2011). Tato zkrácená verze je v aktivaci Bax/Bak několikanásobně účinnější než Bid (Eskes *et al.*, 1999). Kromě toho také způsobuje rychlou remodelaci vnitřní mitochondriální membrány. Při této remodelaci dochází k propojení jednotlivých krist a rozšíření jejich spojů. Tím dochází ke zpřístupnění cytochromu c pro redoxní reakce, což umožňuje jeho kompletní vylití (Scorrano *et al.*, 2002).

#### 4.2.4. VDAC

VDAC1 je protein nacházející se ve vnější mitochondriální membráně. Podílí se na výměně metabolitů a energie mezi cytosolem a mezimembránovým prostorem mitochondrie. Má však také nezastupitelnou roli v mitochondriálně-zprostředkované

apoptóze, konkrétně při výlevu cytochromu c, Smac/Diablo a AIF, do cytosolu (Keinan *et al.*, 2010; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010).

Pokud se buňka nachází ve fyziologických neapoptotických podmínkách, molekuly proteinu VDAC se nachází v monomerní formě. Po indukci apoptózy spolu začnou jednotlivé molekuly VDAC asociovat a vytvářet oligomerní komplexy. Ačkoli funkce těchto komplexů, zatím není zcela jasná, ukazuje se, že mají podíl na uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Stejně jako oligomerizace Bax/Bak, je i homo-oligomerizace VDAC inhibovaná anti-apoptotickými proteiny rodiny Bcl-2, jako je např: Bcl-xL (Keinan *et al.*, 2010; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010).

Pro uvolnění cytochromu c a dalších pro-apoptotických proteinů je důležitá nejenom oligomerizace mitochondriálních proteinů VDAC, ale neméně podstatná je také i funkce jejich N-terminální domény. Tato N-terminální doména má význam při konverzi VDAC oligomerního komplexu na tzv. kanál propustný pro proteiny (protein conductive channel). Podle NMR studií komplex tvoří VDAC  $\beta$ -barel zanořený do membrány a skládá se z  $\beta$ -řetězců a N-terminálního  $\alpha$ -helixu. Oligomerizací proteinů VDAC vzniká v membráně hydrofobní pór, kterým ale nemohou projít nabité proteiny. Pokud buňka obdrží pro-apoptotický signál, amfipatický  $\alpha$ -helix N-terminální domény se přesune dovnitř vzniklého póru a vytvoří tak hydrofilní vnitřní povrch. Není znám mechanismus, který toto přesunutí umožňuje. Ačkoliv změny potenciálu na vnější mitochondriální membráně, oxidačního stavu VDAC nebo fosforylace mohou ovlivňovat konformaci VDAC i N-terminální domény. N-terminální doména VDAC je častým cílem proteinů regulujících apoptózu, především proteinů rodiny Bcl-2, ale také třeba hexokinázy. Svým navázáním nedovolí vstoupit N-terminální doméně dovnitř póru a zabrání tak uvolnění pro-apoptotických faktorů z mitochondrií (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010).

### **4.3. Interakce s Apaf-1**

Apaf-1 je cytosolický protein, který interaguje s cytochromem c a v přítomnosti dATP/ATP tvoří komplex zvaný apoptosom. Tento komplex aktivuje prokaspázy-9. Lidský Apaf-1 se skládá z několika domén důležitých pro sestavení apoptosomu. Jejich názvy jsou odvozeny od homologních pro-apoptotických proteinů u hlístice *Caenorabditis elegans*, neboli háďátka. Jedná se o N-terminální Ced-3 homologní oblast, také nazývanou Hub doména, která obsahuje CARD (caspase recruitment domain) doménu, po ní následuje Ced-4-homologní oblast, ta obsahuje Walkerovy A a B motivy a C-terminální konec

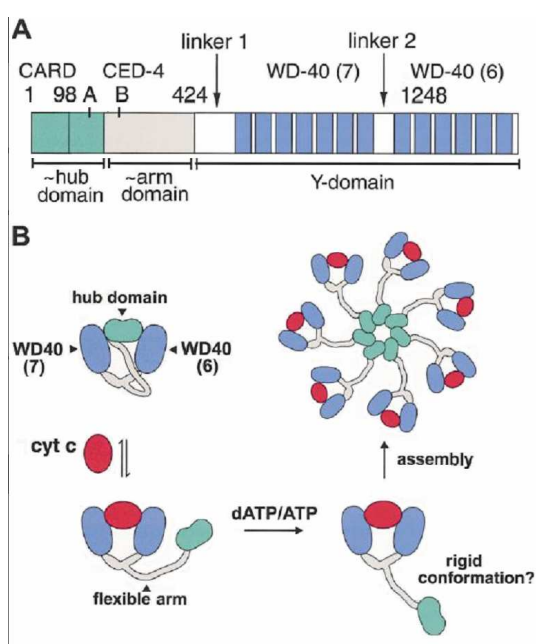


obsahující několikanásobné WD40 repetice. Jedná se o opakující se motiv dvou aminokyselin, aspartátu a tryptofanu (Zou *et al.*, 1997; Acehan *et al.*, 2002). Každá z těchto domén představuje vazebné místo pro jiného partnera. N-terminální oblast interaguje s prokaspázou 9, Walker boxes představují vazebné místo pro nukleotidy a WD40 repetice obsahují vazebné místo pro cytochrom c (Zou *et al.*, 1997) (Obr. 4).

### 4.3.1. Sestavení apoptosomu

Apoptosom je heptamerní komplex, který zajišťuje aktivaci prokaspáz-9. Jeho sestavení je rozhodujícím krokem v mitochondriální dráze programované buněčné smrti. Tento krok vyžaduje vzájemnou interakci Apaf-1, cytochromu c a dATP nebo ATP (Liu *et al.*, 1996). Do dnešní doby bylo provedeno několik pokusů zabývajících se sestavením apoptosomu. Tyto pokusy se shodují v interakci Apaf-1, cytochromu c a dATP/ATP, ale rozcházejí se v reakcích vedoucích k jeho sestavení.

Podle Acehana *et al.* je k sestavení funkčního apoptosomu zapotřebí několika kroků. Apaf-1 se udržuje v autoinhibované konformaci tím, že se jeho Hub doména váže mezi motivy WD40 repetic. Cytochrom c Hub doménu nahradí a naváže se mezi WD40 repetice. Tato interakce umožní Ced-4 homologní doméně navázat dATP nebo ATP, což způsobí konformační změnu Apaf-1. Navázání nukleotidu zabráni reasociaci s WD40 úseky a celá struktura se stane rigidnější. Navázání nukleotidu spouští heptamerizaci komplexu, kterou zajišťují Hub domény Apaf-1. Prokaspázy-9 se na komplex váží pomocí CARD-CARD interakcí (Acehan *et al.*, 2002) (Obr. 4).



**Obrázek 4: Role domén Apaf-1 na sestavení apoptosomu, převzato od Acehan *et al.*, 2002**

- A) Stavba Apaf-1: pozice jednotlivých domén, které se podílí na sestavování apoptosomu.
- B) Mechanismus sestavení apoptosomu. Cytochrom c nahradí Hub domény mezi WD40 repeticemi, navázání dATP/ATP zpevní vzniklou konformaci a umožní tak heptamerizaci komplexu do apoptosomu.

Podle pokusů, které provedl Kim *et al.* se zdá, že v okamžiku, kdy Apaf 1 interaguje s cytochromem c, už má navázané dATP/ATP jako kofaktor. Navázání cytochromu c mezi WD40 repetice ruší autoinhibici Apaf-1 a indukuje hydrolyzu dATP/ATP na dADP/ADP. Hydrolyza dATP/ATP má dva hlavní důvody. Zajišťuje dostatečnou energii pro konformační změnu Apaf-1. Druhým důvodem je, že je tím umožněná následná nukleotidová výměna dADP za dATP/ATP, která umožní vytvoření funkčního apoptosomu. Komplex Apaf-1, cytochromu c a dATP/ATP vytváří funkční heptamer pouze pokud dojde k nukleotidové výměně. V případě, že dojde jenom k navázání cytochromu c a hydrolyze dATP/ATP, ale nedojde k výměně nukleotidů, vytvoří se pouze nefunkční shluky, které nedokáží aktivovat prokaspázy-9 (Kim *et al.*, 2005).

#### **4.3.2. Aktivace prokaspáz-9**

Aktivní kaspáza 9 funguje ve formě antiparalelně uspořádaného dimeru. Každý z monomerů se skládá z malé a velké podjednotky, které vzniknou proteolytickým štěpením zymogenu (Kumar a Colussi, 1999). Prokaspáza 9 se váže do středové oblasti apoptosomu, kde se nachází CARD domény Apaf-1 proteinů a interaguje s nimi svou CARD doménou vždy v poměru 1:1. Zvýšená lokální koncentrace monomerů prokaspázy 9 v apoptosomu nakonec umožní jejich dimerizaci s volnými molekulami prokaspázy-9. Každý z dimerů má jen jedno aktivní katalytické místo a to to, které je více vzdálené od středové části apoptosomu. Jednotlivé monomery prokaspázy-9 spolu interagují pomocí velkých podjednotek a jsou orientovány antiparalelně. K samotné aktivaci dochází proteolytickým štěpením interdoménové smyčky (Acehan *et al.*, 2002).

#### **4.3.3. Regulace tvorby apoptosomu pomocí redox stavu Fe v hemu**

Cytochrom c se v buňce vyskytuje ve dvou vzájemně převoditelných formách: jako redukovaný ferrocytochrom c ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a oxidovaný ferricytochrom c ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Oxidovaná a redukovaná forma cytochromu c jsou si konformačně velmi podobné. Mírné odlišnosti v jejich struktuře jim ale určují rozdílné vlastnosti i funkce (Brown a Borutaite, 2008).

Pokusy provedené na konci 90. let minulého století Kluckem a Hamptonem naznačovaly, že cytochrom c může být schopný aktivovat apoptosom v obou redoxních formách. Hampton ale ukázal, že interakce mezi Apaf-1 a cytochromem c jsou závislé na iontovém prostředí cytosolu (Kluck *et al.*, 1997; Hampton *et al.*, 1998). Pozdější pokusy, které provedli Pan a Suto, už ukazovaly, že pouze oxidovaná forma cytochromu má schopnost aktivovat kaspázy. Také poukázaly na to, že látky schopné redukovat cytochrom c, jako jsou

askorbát, glutathion nebo cystein, inhibují aktivaci apoptosomu (Pan *et al.*, 1999; Suto *et al.*, 2005).

Tuto hypotézu se v roce 2007 pokusili potvrdit také Borutaite a Brown. Jejich pokusy naznačují, že oxidovaná forma cytochromu c má vyšší schopnost aktivovat prokaspázy. U redukované formy je tato schopnost výrazně nižší. Také ukazují, že redoxní stav cytochromu c má významný vliv na regulaci aktivace kaspáz. Na změnách redoxního stavu cytochromu se může podílet celá řada proteinů a enzymů. Jelikož ale Borutaite a Brown sledovali pouze aktivaci kaspáz a nezabývali se sestavením apoptosomu, není zjevné, co se v tomto případě stalo s apoptosomem. Redukovaný cytochrom c mohl mít nižší afinitu k Apaf-1 nebo naopak vyšší afinitu k jiným buněčným proteinům (Borutaite a Brown, 2007).

Z těchto pokusů vyplývá, že interagovat s Apaf-1 a tím vytvářet apoptosom, může jenom cytochrom v oxidovaném stavu. Při vylití cytochromu do cytosolu ale nezáleží na jeho redoxním stavu, dochází k jeho výlevu jak v redukované tak oxidované formě. V cytosolu pak následně dochází velmi rychle k jeho redukcii. Cytochrom c může být redukován askorbátem, superoxidovým radikálem, glutathionem nebo NO syntázou. Není ale známo, jestli se tyto enzymy podílí na redukcii cytochromu c v *in vivo* podmínkách. I přes tuto redukcii může docházet k sestavení apoptosomu, jelikož na jeden apoptosom je potřebných 7 molekul cytochromu c a u přibližně 5 % vylitého cytochromu c k redukcii nedochází. Pokud tedy dojde k uvolnění dostatečného množství cytochromu c, dojde i k vytvoření dostatečného počtu apoptosomů a spuštění kaspázové kaskády. Jedním z důvodů rychlé redukce cytochromu c může být protekce proti aktivaci kaspázové kaskády při náhodném vylití menšího množství cytochromu c (Ripple *et al.*, 2010).

#### **4.3.4. Regulace pomocí iontů**

Další možností, jak ovlivnit sestavení apoptosomu je kompetitivní inhibice interakce mezi cytochromem c a  $K^+$ .  $K^+$  ion se za fyziologických koncentracích váže na Apaf-1 a brání tím navázání cytochromu c. Tyto interakce brání sestavení apoptosomu a aktivaci kaspáz při malém výlevu cytochromu c. Aby mohlo dojít k aktivaci musí se uvolnit z mitochondrií větší množství cytochromu c, aby mohl tuto kompetitivní inhibici překonat. Při apoptotické signalizaci dochází k poklesu množství  $K^+$  a kompletnímu vylití cytochromu c, což tuto inhibici obejde a může dojít k aktivaci kaspáz. Tato kompetitivní inhibice tak představuje obranný mechanismus proti náhodnému vylití menšího množství cytochromu c (Cain *et al.*, 2001).

Fyziologická koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu inhibuje sestavení apoptosomu a tím aktivaci prokaspáz-9.  $\text{Ca}^{2+}$  se váže na Apaf-1 a svou interakcí inhibuje nukleotidovou výměnu nezbytnou pro sestavení apoptosomu (Bao *et al.*, 2006).

#### 4.3.5. Regulace pomocí nukleotidů

Třetí možnost regulace sestavení apoptosomu představují interakce Apaf-1 s nukleotidy. V cytosolu se za fyziologických podmínek vyskytují nukleotidy, NTP nebo dNTP, ve vysokých koncentracích (mM). Tato koncentrace sama o sobě má schopnost inhibovat tvorbu apoptosomu i aktivaci kaspáz. Inhibice je způsobena tím, že se naváže na cytochrom c. Zabrání tak interakci mezi cytochromem c a Apaf-1 a tím vytvoření apoptosomu. Inhibici aktivace kaspáz způsobují např.: i koenzymy NAD, NADP nebo FAD. Inhibiční efekt nukleotidů na aktivaci kaspáz je účinný jenom ze začátku, jakmile jednou dojde k sestavení apoptosomu a aktivaci kaspáz, je inhibiční efekt neúčinný. Na interakci mezi cytochromem a Apaf-1 se podílí 4 Lys cytochromu c a aspartát WD40 repetice Apaf-1, což znamená, že pokud se nukleotid naváže na některý z těchto aminokyselinových zbytků, nebo v jeho blízkosti, zabrání tím následné interakci mezi cytochromem c a Apaf-1. Chandra *et al.* navrhli několik způsobů, jakými může být tato inhibice překonána. V případě déle trvající apoptotické stimulace, může dojít k vylití velkého množství cytochromu c a tím inhibiční efekt překonat. Druhou možností může být pokles množství nukleotidů v buňce při indukci apoptózy (Chandra *et al.*, 2006).

#### 4.3.6. Regulace pomocí apocytochromu c

Apocytochrom c je proteinová část cytochromu c, po přidání hemové molekuly se z něj stává holocytochrom c. Apocytochrom c se tedy od cytochromu c liší jenom nepřítomností hemové molekuly. Navázání Apaf-1 na apocytochrom c má za následek zablokování tvorby apoptosomu a aktivace kaspázy-9. Regulační úloha tohoto proteinu spočívá v tom, že s cytochromem c kompetuje o vazebné místo na Apaf-1. Apo cytochrom c ale nemůže blokovat funkci už jednou sestaveného apoptosomu. Navázání apocytochromu c nemusí být pro auto-inhibici Apaf-1 dostačující. Pokud se Apaf-1 s navázanou apo formou cytochromu c dostane do apoptosomu, může tento apoptosom inaktivovat celý (Martin *et al.*, 2004).

#### **4.4. Další funkce cytochromu c v apoptóze– externalizace PS**

Oxidovaná forma cytochromu c uvolněná při apoptóze do cytosolu má peroxidázovou aktivitu, která je zprostředkována jeho vazbou na fosfatidylserin (PS) na vnitřní straně plasmatické membrány. Díky této aktivitě může selektivně katalyzovat oxidaci PS na plasmatické membráně. Takto oxidovaný PS je zřejmě preferenčně transportován na vnější stranu plasmatické membrány, kde slouží jako tzv „eat me“ signál pro fagocytující buňky (Jiang *et al.*, 2003).

## 5. Závěr

Úloha cytochromu c v apoptotické buněčné smrti se ukázala být rozsáhlým tématem, které si ale pozornost jistě zaslouží.

První část práce shrnula poznatky týkající se funkce cytochromu c v buňce a jeho biosyntézy, především translokaci jeho prekurzoru do mezimembránového prostoru mitochondrie. Ačkoli byly provedeny pokusy, které prokazují, že k traslokaci apocytochrom c využívá část klasického importního mechanismu, přesné místo, kde k ní dochází, prozatím nebylo objeveno.

Druhá a třetí část práce shromáždila dostupné znalosti mechanismů majících funkci v apoptotické programované buněčné smrti. Zaměřovala se především na procesy, kterých se účastní cytochrom c. Do doby asi před 20 lety byl cytochrom c považován za molekulu mající roli v elektrontransportním řetězci mitochondrie. V posledních letech bylo provedeno značné množství pokusů, které odhalily další důležitou funkci cytochromu c, konkrétně jeho úlohu v apoptóze. Postupně byly odhalovány procesy vedoucí k jeho uvolnění do cytosolu stejně jako mechanismy regulace těchto procesů. Uvolnění cytochromu c představuje centrální proces apoptózy, který nastává jak při aktivaci vnitřní apoptotické dráhy, tak i dráhy vnější. Práce se dále zabývala spoluprací cytochromu c s Apaf-1 na tvorbě apoptosomu, přičemž shrnula i procesy vedoucí k inhibici jeho sestavení.

Postupně se stávalo více zřejmé, že cytochrom c představuje klíčovou molekulu, která se podílí na udržování energetického metabolismu uvnitř mitochondrie a svými pro-apoptotickými interakcemi má také nezastupitelnou úlohu v regulaci buněčného života. Vzrůstající poznatky o mechanismech vedoucích k uvolňování cytochromu c a jeho následných interakcích při aktivaci prokaspáz-9 mohou mít své využití jak v dalším výzkumu, tak v medicínských (Nakagawa a Osari, 1996) nebo diagostických (Adachia *et al.*, 2004) postupech.

## Seznam literatury

- Acehan, D., Jiang, X. *et al.* 2002. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. *Molecular cell*, 9, 423-432.
- Adachia N., Hirota M. *et al.* 2004. Serum cytochrome c level as a prognostic indicator in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 342, 127–136.
- Ahting, U., Thun C., *et al.* 1999. The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biology*, 147, 959–968.
- Antonsson, B. Montessuit, S. *et al.* 2000. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochemical Journal*, 345, 271–278.
- Bao, Q., Lu, W. *et al.* 2006. Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. *Molecular Cell*, 25, 181-192.
- Bernardi, P., Azzone, G.F. 1981. Cytochrome c as an Electron Shuttle between the Outer and Inner Mitochondrial Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 7187-7192.
- Borutaite, V., Brown, G.C. 2007. Mitochondrial Regulation of Caspase Activation by Cytochrome Oxidase and Tetramethylphenylenediamine via Cytosolic Cytochrome c Redox State. *Journal Biological Chemistry*, 282, 31124-31130.
- Brown, G.C., Borutaite, V. 2008. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777, 877–881
- Cain, K., Langlais, C. *et al.* 2001. Physiological Concentrations of K<sup>+</sup> Inhibit Cytochrome c-dependent Formation of the Apoptosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 41985-41990.
- Certo, M., Moore, V.G., *et al.* 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic Bcl-2 family members. *Cancer Cell*, 9, 351-365.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, 341, 233-249.
- Daugas, E., Susin, S.A. *et al.* 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *The FASEB Journal*, 14, 725-739.
- Deveraux, Q.L., Roy, N. *et al.* 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal*, 17, 2215 – 2223.
- Diekert, K., Kroon, A.I.P.M. *et al.* 2001. Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *The EMBO Journal*, 20, 5626-5635.
- Eskes, R., Desagher, S. *et al.* 1999. Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 929-935.
- Fisher, W.R., Taniuchi, H. Anfinsen, Ch.B. 1973. On the Role of Heme in the Formation of the Structure of Cytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 3188-3195.
- Flanagan, L., Sebastia, J. *et al.* 2011. Dimerization of Smac is crucial for its mitochondrial retention by XIAP subsequent to mitochondrial outer membrane permeabilization. *Biochimica et Biophysica*, 1813, 819-826.

- Gao, Z., Tlan, Y. *et al.* 2007. A Dimeric Smac/Diablo Peptide Directly Relieves Caspase-3 Inhibition by XIAP. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 30718-30727.
- Gogvadze V., Orrenius S. 2006. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chemico-Biological Interactions*, 163, 4-14.
- Grütter M.G. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 649-655.
- Halestrap, A.P. 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46, 821-831.
- Hampton, M.B., Zhivotovsky, B. *et al.* 1998. Importance of the redox state of cytochrome c during caspase activation in cytosolic extracts. *Biochemical Journal*, 329, 95-99.
- Hockenbery D.M., Nunez G. *et al.* 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334-336
- Chai, J., Shiozaki, E. *et al.* 2001. Structural Basis of Caspase-7 Inhibition by XIAP. *Cell*, 104, 769-780.
- Chandra, D., Bratton, S.B. *et al.* 2006. Intracellular Nucleotides Act as Critical Prosurvival Factors by Binding to Cytochrome C and Inhibiting Apoptosome. *Cell*, 125, 1333-1346.
- Chang D. W. 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *The EMBO Journal*, 22, 4132-4142.
- Chen, Y.R., Deterding, L.J. *et al.* 2002. Protein Oxidation of Cytochrome c by Reactive Halogen Species Enhances Its Peroxidase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 29781-29791.
- Jiang, J., Huang, Z. *et al.* 2008. Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 145-150.
- Jiang, J., Serikan, B.F. *et al.* 2003. Peroxidation and externalization of phosphatidylserine associated with release of cytochrome c from mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 814-825.
- Jourdain, A., Martinou, J.C. 2009. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1884-1889.
- Kagan, V.E., Tyurin, V.A. *et al.* 2005. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature Chemical Biology*, 1, 223 - 232.
- Keinan, N., Tyomkin, D., Barmatz, V.S. 2010. Oligomerization of the Mitochondrial Protein Voltage-Dependent Anion Channel Is Coupled to the Induction of Apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 30, 5698-5709.
- Kim, H., Tu, H.CH. *et al.* 2009. Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Molecular Cell*, 36, 487-499.
- Kim, H.E., Du, F. *et al.* 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *PNAS*, 102, 17545-17550.
- Kluck, R.M., Martin, S.J. *et al.* 1997. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO Journal*, 16, 4639-4649.
- Korshunov, S.S., Krasnikov, B.F. *et al.* 1998. The antioxidant functions of cytochrome c, *FEBS Letters*, 462, 192-198.



- Kranz, R.G., Richard-Fogal, C. *et al.* 2009. Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control. *Microbiology and Molecular Biology Rev.*, 73, 510-528.
- Kumar, S., Colussi, P.A. 1999. Prodomains, adaptors, oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochemical Science*, 24, 1–4.
- Kuwana, T., Mackey, M.R. *et al.* 2002. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111, 331-342.
- Letai, A., Bassik, M.C. *et al.* 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2, 183–192.
- Liu, X., Kim, C.N. *et al.* 1996. Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147–157.
- Loeffler, M., Daugas, E. *et al.* 2001. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *The FASEB Journal*, 15, 758-767.
- Martin, A.G., Nguyen, J. *et al.* 2004. Apo cytochrom c inhibits caspases by preventing apoptosome formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319, 944-950.
- Mathai, J.P., Germain, M., Shore, G.C. 2005. BH3-only BIK Regulates BAX,BAK-dependent Release of Ca<sup>2+</sup> from Endoplasmic Reticulum Stores and Mitochondrial Apoptosis during Stress-induced Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 23829-23836.
- Mayer, A., Neupert, W., Lill R. 1995. Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *The Journal Biological Chemistry*, 270, 12390-12397.
- Muzio, M., Stockwell B.R. *et al.* 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 2926-2930.
- Nakagawa E., Osari S. 1996. Long-term therapy with cytochrome c, flavin mononucleotide and thiamine diphosphate for a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Brain and Development*, 18, 68-70.
- Nakagawa, T., Shimizu, S. *et al.* 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434, 652-658.
- Nakano, K., Vousden, K.H. 2001. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*, 7, 683-694.
- Oakes, S., Opferman, J.T. *et al.* 2003. Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1334-1340.
- Oda, E., Ohki, R. *et al.* 2000. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288, 1053-1058.
- Ott, M., Robertson J.D. *et al.* 2001. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Biochemistry*. 99, 1259-1263.
- Pan, Z., Voehringer, D.W., Meyn, R.E. 1999. Analysis of redox regulation of cytochrome c-induced apoptosis in a cell-free system. *Cell Death Differentiation*, 6, 683–688.
- Parijs L., Abbas A. K. 1996. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 8, 355-359.

- Park, I.S., Moon, H.R. *et al.* 2004. Rearrangement of tryptophan residues in caspase-3 next term active site upon previous term activation next term, *Biochimica et Biophysica*, 1700, 5-9.
- Perez, C.G., Roy, S.S. *et al.* 2011. Bid-induced mitochondrial membrane permeabilization waves propagated by local reactive oxygen species (ROS) signaling. *Cell Biology*, 109, 4497-4502.
- Perry A.J., Rimmer K.A. *et al.* 2008. Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 265-274
- Rasola, A., Sciacovelli, M. *et al.* 2010. Signal transduction to the permeability transition pore, *Intracellular Ion Channels*. 583, 1989-1996.
- Riedl, S.J., Renatus, M. *et al.* 2001. Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104, 791-800.
- Ripple, M.O., Abajian, M., Springett, R. 2010. Cytochrome c is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis*, 15, 563-573.
- Rostovtseva T.K., Antonsson B. 2004. Bid, but Not Bax, Regulates VDAC Channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 13575-13583.
- Scorrano, L., Ashiya, M. *et al.* 2002. A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Developmental Cell*, 2, 55-67.
- Scorrano, L., Oakes, S.A. *et al.* 2003. and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>: A Control Point for Apoptosis, *Science*, 300, 135-139
- Sheridan, P., Delivani, C. *et al.* 2008. Bax or Bak induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome c. *Molecular cell*, 31, 570-585.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, 9, 459-470.
- Shoshan-Barmatz, V.S., Keinan, N. *et al.* 2010. Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797, 1281-1291.
- Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M.L. 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, 39, 257-288.
- Speidel, D., 2009. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology*, 20, 14-24.
- Suto, D., Sato, K. *et al.* 2005. Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism. *Biochemical Journal*, 392, 399-406.
- Theorell, H., Akesson, A. 1941. Studies on Cytochrome c. II.: The Optical Properties of Pure Cytochrome c and Some of Its Derivatives. 63, 1812-1818.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G. *et al.* 2000. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell*, 102, 43-53.
- Voet, D., Voet, J.G. 2011. *Biochemistry*, fourth edition
- Walensky, L.D., Pitter, K. *et al.* 2006. A Stapled BID BH3 Helix Directly Binds and Activates BAX. *Molecular Cell*, 24, 199-210.

Wang, H., Takemoto, Ch. *et al.* 2009. Novel dimerization mode of the human Bcl-2 family protein Bak, a mitochondrial apoptosis regulátor. *Journal of Structural Biology*, 166, 32–37.

Yadaiah, M., Rao, P.N. *et al.* 2007. High affinity of Bcl-xL to cytochrome c: Possible relevance for interception of translocated cytochrome c in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1370-1379.

Zou, H., Henzel, W. J. *et al.* 1997. Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3. *Cell*, 90, 405-413.