

# Virusi i apoptoza

**Mateja JANKOVI], dr. med.**  
**Alemka MARKOTI], doc. dr. sc., dr. med.**

Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljevi«, Zagreb

**Ključne riječi**  
*apoptoza*  
*virus*

**Key words**  
*apoptosis*  
*virus*

**Primljeno:** 2007-01-23

**Received:** 2007-01-23

**Prihvaćeno:** 2007-04-19

**Accepted:** 2007-04-19

## Apoptoza

Programirana stanična smrt ili apoptoza je mehanizam kojim se neeljene stanice odstranjuju iz organizma, a prvi je put opisana 1972. [1]. Ona je od iznimne važnosti kako tijekom embrionalnog razvoja, tako i za održavanje tkivne homeostaze [2]. Poremećaji u regulaciji apoptoze imbenici su u mnogobrojnim patološkim stanja. Manjkavost procesa apoptoze može rezultirati razvojem tumora, autoimunih bolesti te izbijanjem virusne infekcije. Za razliku od toga, neurodegenerativni poremećaji, AIDS i ishemične bolesti mogu biti izazvane ili pojačane prekomjerenom apoptozom [3]. Morfološke i biokemijske promjene karakteristične za apoptozu su: kondenzacija kromatina, disfunkcija mitohondrija te aktivacija staničnih proteaza i nukleaza s posljedičnom razgradnjom DNK [4]. U kona-

Uvodnik

Apoptoza je mehanizam kojim se neeljene stanice odstranjuju iz organizma, a poremećaji u regulaciji apoptoze imbenici su u mnogobrojnim patološkim stanja. Obzirom na važnu ulogu apoptoze u djelovanju imunološkog sustava, virusi su razvili mnogobrojne mehanizme kojima ometaju njezin proces i time osiguravaju uspješno razmnožavanje i izbijanje. Sprežavanjem ili odgodom apoptoze može se produžiti raspoloživi vremenski period za proizvodnju novih viriona prije nego putovi biosinteze stanice domaćina, kojima se virus koristi, budu razoreni. S druge strane, određeni genski proizvodi virusa djeluju kao induktori apoptoze, vjerojatno s ciljem otpuštanja i izbijanja viriona iz inficirane stanice domaćina bez poticanja odgovarajućeg imunološkog odgovora. Ovim smotom eljeli saeti glavne mehanizme stanične apoptoze i pružiti primjere na koji način virusi i njihovi genski produkti mogu utjecati na taj proces. Napredak molekularne biologije otvorio je epohu u kojoj bi se virusni geni mogli iskoristiti za proizvodnju životavog niza terapeutika.

## Viruses and apoptosis

Leading article

Apoptosis is an active process of cell death that doesn't initiate immune system response. Manipulation of the signalling cascades regulating apoptosis can result in a wide variety of human diseases. Viruses have the ability to affect the apoptotic process within the host cell. They can benefit either from the promotion or the inhibition of apoptosis. The benefits of virus avoiding the apoptotic process are obvious but the onset of apoptosis can also be advantageous. It enables the dissemination of virus without initiating a concomitant inflammatory host response. The purpose of this article was to give an overview of the mechanisms of apoptosis and examples for some of the many ways in which viruses and their gene products can influence this process. The progress of molecular biology has opened an era in which viral genes could be used for the production of different therapeutics.

nici od stanice preostaju apoptotička tjeleca, koja prepoznaju i odstrane profesionalni fagociti. Za razliku od nekroze, apoptoza ne uzrokuje proizvodnju medijatora upale i općenito upalne promjene odnosno oštećenje tkiva. Identificirano je nekoliko bitnih biokemijskih markera apoptoze: fragmentacija nuklearne DNK, aktivacija cisteinskih proteaza nazvanih kaspazama te ekternalizacija fosfatidilserinskih (PS) ostataka na staničnoj površini [4]. Ipak, presudni je događaj tijekom apoptoze cijepanje i aktivacija kaspaza [5, 6].

## Kaspaze

Kaspaze spadaju u porodicu cisteinskih proteaza specifičnih za aspartat i u sisavaca ih je do sada otkriveno i identificirano 14. Dijele se na one potrebne za dozrijeva-

nje citokina, kao što su kaspaze 1, 4 i 5 i na one izravno uključene u proces apoptoze. Kaspaze, koje sudjeluju u procesu apoptoze se, prema strukturalnim i funkcijskim istraživanjima dijele u dvije skupine: inicijacijske kaspaze (kaspaze 8, 9 i 10) i izvršne kaspaze (kaspaze 3, 6 i 7). Inicijacijske kaspaze započinju proces apoptoze i zadužene su za proteolitičko cijepanje i aktivaciju izvršnih kaspaza, koje su pak odgovorne za proteolitičko cijepanje velikog broja staničnih proteina i posljednju smrt stanice [5, 7]. Kaspaza 8 se u literaturi često naziva i FLICE (engl. *Fas associated death domain like IL-1 $\beta$  converting enzyme*). Nadzor nad aktivnosti kaspaza je od vitalne važnosti unutar zdrave stanice, a vrše ga kako proteini kodirani od strane stanice, tako i oni kodirani od strane patogena [8].

### Porodica Bcl-2 proteina i regulacija apoptoze

Bcl-2 je bio prvi onkogen za kojeg je dokazano da inhibira staničnu smrt (npr. kod folikularnih limfoma). Po prvi je put pokazano da tumorigeneza ovisi, između ostalog, o sposobnosti promijenjene stanice da spriječi apoptozu [9]. Složena mreža međudjelovanja proteina iz Bcl-2 porodice integrira signale staničnog stresa i homeostaze formirajući tako kontrolnu točku u kojoj se odlučuje da li će stanica živjeti ili ne [2, 10]. U sisavaca je opisano 30 Bcl-2 srodnih proteina koji posjeduju zajedničke regije nazvane Bcl-2 homologne (BH) domene [11, 12]. Članovi Bcl-2 porodice mogu se svrstati u dvije grupe: jednu koja potiče preživljavanje stanice i drugu koja potiče apoptozu. Pripadnici grupe koja potiče preživljavanje stanice, kao npr. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 i A1, imaju četiri srodne homologne regije (BH 1–4) dok se pripadnici grupe koja potiče apoptozu mogu podijeliti u dvije funkcijski i strukturalno različite podgrupe. Prvu podgrupu sačinjavaju proteini: Bim, Bid, Bad, Bik, Bmf i Hrk koji imaju isključivo BH3 homolognu regiju (engl. »BH-3 only«) i funkciju »uzvodnih stražara«, odnosno aktiviraju se u odgovoru na različite oblike staničnog stresa [13]. U drugu podgrupu spadaju Bax i Bak, koji posjeduju BH1, BH2 i BH3 homologne regije, a funkcijski se nalaze nizvodno od »BH3-only« proteina te su ključni za samo odvijanje apoptoze [14–17]. Pojednostavljeno bismo mogli reći da se signali smrti u mitohondrije prenose putem »BH3-only« proteina, koji potom potiču aktivaciju dvaju pro-apoptotičkih članova Bcl-2 porodice, Bak i Bax, a oni igraju ključnu ulogu u otpuštanju citokroma c u citoplazmu.

### Putevi apoptoze

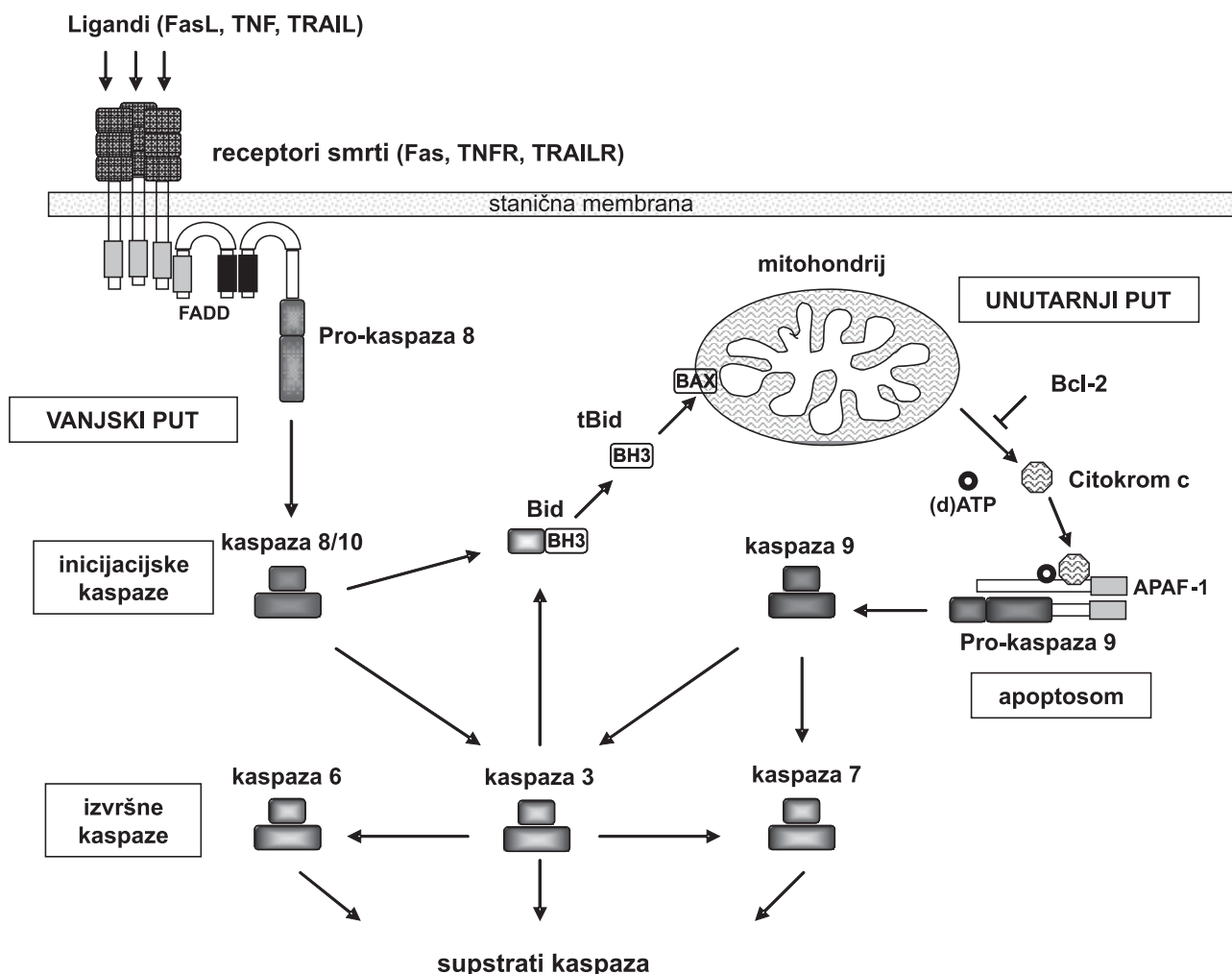
U sisavaca su opisana dva glavna puta programirane stanične smrti, unutarnji i vanjski, a oba u konačnici rezultiraju aktivacijom izvršnih kaspaza [18]. Apoptoza pokrenuta putem »receptora smrti« uobičajeno se naziva vanjskim putem, za razliku od unutarnjeg puta, koji ovisi o općem metaboličkom stanju stanice i signalima prenošenim kroz mitohondrije. Postoji komunikacija između vanjskog i unutarnjeg puta apoptoze u obliku cijepanja proteina Bid, pro-apoptotičkog člana porodice Bcl-2 [19] (slika 1).

### Pokretanje apoptoze putem »receptora smrti«

»Receptori smrti« spadaju u porodicu receptora za faktor tumorske nekroze (TNFR), a karakterizira ih posjedovanje citoplazmatske domene smrti (DD, engl. *death domain*). U njih se ubrajaju receptor za Fas (CD95, Apo1), receptori za ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (TRAIL-R1 i TRAIL-R2, engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 i 2*) i receptor za sam faktor tumorske nekroze (TNFR-1). Vežanjem liganda (FasL/CD95L, TNF, TRAIL) na pripadajući receptor smrti dolazi do trimerizacije receptora i regrutacije adapterskih proteina i stvaranja signalnog kompleksa koji inducira smrt (DISC, engl. *death inducing signaling complex*) [20, 21]. Adapterski proteini koji sudjeluju u ovom procesu su: domena smrti povezana s Fas-om (FADD, engl. *Fas associated death domain*) i domena smrti povezana s TNFR1 (TRADD, engl. *TNFR1-associated DD containing protein*). Pozicioniranjem prokaspaze 8 i/ili 10 proksimalno u DISC-u putem efektorske domene smrti (DED, engl. *death effector domain*) dolazi do aktivacije navedenih kaspaza. Razina aktivacije kaspaze 8 upravlja daljnjim slijedom događaja. Ukoliko je razina dovoljna, dolazi do izravne aktivacije kaspaze 3 i posljednje smrti stanice [22]. U slučaju nedovoljne količine aktivirane kaspaze 8, apoptoza se nastavlja amplifikacijom kroz mitohondrije i to putem aktivacije proteina Bid [19, 22].

Fas/FasL sustav igra veliku ulogu u imunološkom sustavu jer je od esencijalne važnosti za normalni razvoj limfocita T i B. Osim što ima ključnu ulogu u regulaciji klonalne ekspanzije limfocita T posredujući u uklanjanju aktiviranih limfocita T na periferiji, odgovoran je i za eliminaciju onih limfocita T koji nisu primili drugi signal putem kostimulatornih molekula [23]. Fas igra ključnu ulogu i u pozitivnoj i negativnoj selekciji tijekom razvoja limfocita B i od neophodne je važnosti za održavanje imunološke tolerancije [24]. Nadalje, Fas/FasL sustav čini bitan mehanizam odstranjivanja virusom zaraženih i zloćudno promijenjenih stanica putem FasL pozitivnih citotoksičnih limfocita T [23, 25]. Stoga, ne iznenađuje da su virusi koji napadaju stanice imunološkog sustava, a posebice oni koji vode k zloćudnoj promjeni stanica, razvili posebne mehanizme za izbjegavanje apoptotičkih signala prenošenih putem Fas/FasL sustava.

Iako su normalne fiziološke funkcije TRAIL-a još uvijek aktivno područje istraživanja, zna se da limfociti T i NK-stanice koriste TRAIL da bi pokrenuli apoptozu u virusom-inficiranim i tumorskim stanicama [26]. Poznato je da mnogi virusi moduliraju TRAIL put mijenjajući ekspresiju TRAIL i/ili TRAIL receptora ili sintetizirajući proteine koji ometaju normalni put signalizacije pa se nameće zaključak da TRAIL put igra važnu ulogu u borbi protiv virusnih infekcija [27].



**Slika 1.** Putevi apoptoze  
 Vanjski put apoptoze pokre}e se vezanjem liganda (FasL, TRAIL, TNF) na odgovaraju}i »receptor smrti«. Dolazi do aktivacije inicijacijske kaspaze 8 i/ili 10, a potom izvr{nih kaspaza 3, 6 i 7. Proces mo`e biti poja-an uklju-ivanjem mitohondrija putem cijepanja proteina Bid. Unutarnji put apoptoze po-inje pucanjem vanjske membrane mitohondrija, izlaskom citokroma c u citoplazmu i formiranjem apoptosoma. Potom se aktivira inicijacijska kaspaza 9 i izvr{ne kaspaze 3, 6 i 7. ATP – adozin trifosfat; Bid, Bax – pro-apoptotiki -lanovi obitelji Bcl-2; APAF 1 – apoptotiki aktiviraju}i faktor proteaza 1; TNF – faktor tumorske nekroze; TNFR – receptor za faktor tumorske nekroze; Fas – receptor iz obitelji TNF, -lan 6; FasL – Fas ligand; TRAIL – ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF; TRAIL-R – receptor za TRAIL

**Figure 1.** Apoptotic Pathways  
 External apoptotic pathway is initiated by ligation of FasL, TRAIL or TNF on respective »death receptor«. This leads to the activation of the initiator caspase 8 or/and 10, followed by the activation of the effector caspase 3, 6 and 7. The process can be amplified through the mitochondria via the cleavage of the protein called Bid.  
 Internal apoptotic pathway is initiated by the bursting of the outer mitochondrial membrane. Cytochrome c appears in the cytoplasm and takes part in the formation of apoptosome. This leads to the activation of the initiator caspase 9 and, finally, to the activation of the effector caspases 3, 6 and 7.  
 ATP - adenosine triphosphate; Bid, Bax – pro-apoptotic members of Bcl-2 family; APAF 1 – apoptotic protease activating factor 1; TNF – Tumor necrosis factor; TNFR – TNF receptor; Fas – eng. TNF receptor superfamily, member 6; FasL – Fas ligand; TRAIL – TNF-related apoptosis inducing ligand; TRAIL-R – TRAIL receptor

**Mitohondriji kao sredi{nji regulatori unutarnjeg puta apoptoze**

Bcl-2 porodica proteina upravlja unutarnjim putem apoptoze. Aktivirati ga mo`e o{te}enje DNK, nedostatak hormona rasta, dvostruko uzvojita RNK (dsRNK), ke-

moterapija ili virusna infekcija [28, 29]. Mitohondrij ima sredi{nju ulogu u preno{enju i uskla|ivanju tih signala, koji uzrokuju poreme}aj propusnosti mitohondrijske membrane i kona-no njezina puknu}a i otpu{tanja pro-apoptotikih proteina u citoplazmu [30, 31]. Me|u tim proteinima nalazi se i citokrom c, neophodna komponenta

prijenosa elektrona za vrijeme oksidativne fosforilacije. Kompleks citokroma c, adapterske molekule Apaf-1 (apoptoti-ki aktiviraju) i faktor proteaza, engl. *apoptotic protease activating factor 1*) i kaspaze 9 naziva se apoptosom. Apoptosom je zadužen za aktivaciju pro-kaspaze 9 i pokretanje izvršnih kaspaza, a cijeli je proces ovisan o adenozin trifosfatu (ATP) [32]. Mitohondriji, uz to (to su središnji regulatori unutarstani-puta, sudjeluju i u vanjskom putu apoptoze. Poveznica ovih dvaju putova je aktivacija proteina Bid [19, 22]. Granzim B je serinska proteaza koja u stanicu ulazi putem interakcije s citotoksi-kim limfocitom T. Granzim B može uzrokovati apoptozu putem višestrukih mehanizama, ali je jedan od najvažnijih aktivacija proteina Bid. [78].

## Virusi i apoptoza

Obzirom na važnu ulogu apoptoze u djelovanju imunološkog sustava, virusi su razvili mnogobrojne mehanizme kojima ometaju kako unutarnje tako i vanjske apoptotske kaskade i time osiguravaju uspješno razmnožavanje i širenje [33, 34]. Sprežavanjem ili odgodom apoptoze može se produljiti raspoloživi vremenski period za proizvodnju novih viriona prije nego putevi biosinteze stanice domaćina, kojima se virus koristi, budu razoreni. S druge strane, određeni genski proizvodi virusa djeluju kao induktori apoptoze, vjerojatno s ciljem lakšeg otpuštanja i širenja viriona iz inficirane stanice domaćina [35–38]. Susjedne stanice fagocitiraju apoptotička tjeleca u kojima se nalaze virioni te se na taj način omogućava širenje virusa bez poticanja pratećeg imunološkog odgovora u domaćina [38].

Osim biokemijskih manipulacija puta apoptoze, postoje i druge strategije kojima virusi izbjegavaju po njih negativne učinke apoptoze. Virus se može umnožavati velikom brzinom i proizvesti znatan broj viriona prije nego je u stanici domaćinu moguće potaknuti imunološki odgovor. Ovaj pristup koristi većina RNK virusa, uključujući i virus influence [40]. Jedna od strategija je i kriptička infekcija. Virus inficira stanicu, ostane neotkriven i izbjegne uništenje stanice domaćina (to mu omogućava produktivnu infekciju [41, 42].

Nadalje, nije neobično da isti virus posjeduje kod za proteine koji su i pro- i anti-apoptotički. Virus humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) jedan je od takvih virusa. Protein HIV-a Nef potiče apoptozu putem receptora smrti povećanjem ekspresije TNF [43], a protein HIV-a Tat povećanom ekspresijom Fas (CD95) na staničnoj površini [44]. Međutim, pokazano je da je protein Tat sposoban i izbjeći smrt stanice povećanjem unutarstanične razine Bcl-2 [45].

Iz svega navedenog, jasno da su virusi morali razviti raznovrsne strategije inhibicije odnosno promocije apoptoze. Njihov utjecaj na kaskadu stanične smrti može se odvijati na bilo kojoj od razina, od vezivanja na stani-

receptor smrti do regulacije na unutarstaničnoj razini (tablica 1).

### Utjecaj na receptore smrti

Bio-raspoloživost liganada za receptore iz TNF porodice može se regulirati proizvodnjom topivih receptora – »mamaca« – koji nastaju cijepanjem i odvajanjem izvanstaničnog dijela receptora od njegove unutarstanične signalne domene ili pak proteinima sa sposobnošću vezanja na isto vezno mjesto. Mnogi virusi iz porodice poxvirusa sadrže avaju različite TNFR-2 ortologe koji vežu TNF i time sprječavaju staničnu smrt [46, 47]. Adenovirusi pak koriste drugu strategiju – smanjuju prisutnost samih receptora za FasL [48, 49] i TRAIL [50, 51] na površini inficirane stanice. Pored opisanih strategija »prve linije obrane« usmjerenih inhibiranju međudjelovanja liganda i receptora, virusi su razvili nekoliko mehanizama blokiranja prijenosa signala nakon vezivanja liganda na »receptor smrti«. Jedan od najbolje proučenih i opisanih slučajeva je primjer virusnih FLICE/kaspaza 8 inhibitornih proteina (vFLIP, od engl. *viral FLICE inhibitory protein*), koji sadrže avaju DED i inhibiraju aktivaciju kaspaze 8 unutar DISC-a. Genski kod za vFLIP proteine sadrže avaju mnogi virusi iz porodice  $\gamma$ -herpesvirusa, kao i ljudski poxvirus, molluscum contagiosum virus (MCV) [52–55]. Humani papilomavirus 16 (HPV-16) sadrže avaju dva različita proteina za koje je utvrđeno da inhibiraju apoptozu na razini DISC-a. HPV-16 E5 protein inhibira apoptozu supresijom stvaranja DISC-a u staničnoj liniji humanih keratinocita tretiranih s TRAIL-om [56], dokim se E6 protein natječe s TRADD veću i se izravno na citoplazmatski rep TNFR1 i na taj način inhibira ubijanje inficiranih mišjih fibroblasta [57]. Za NS5A protein hepatitis C virusa (HCV) pokazano je da interakcijom s TRADD inhibira TNF-posredovano ubijanje hepatocita u transgeninim miševima [58]. Sve u svemu, čini se da je regrutacija citoplazmatskih adapterskih proteina kako bi se modulirala signalizacija putem receptora smrti uspješna strategija, koju koristi velika većina virusa.

### Supresori kaspaza

Postoji i nekoliko strategija inhibicije aktivacije kaspaza. Anti-apoptotički protein humanog citomegalovirusa (CMV), UL36, djeluje kao virusni inhibitor aktivacije kaspaze-8 [59]. UL 36 može dokinuti Fas-om pokrenutu apoptozu, ali nije homologan niti jednom poznatom staničnom proteinu. Mnogi poxvirusi nose uputu za kodiranje serpina (inhibitora serinskih proteaza) koji mogu vezati za i spriječiti djelovanje staničnih kaspaza [60]. Bakulovirusni protein p35 inhibira kaspaze 1-4 i kaspazu 7 [61] Iako p35 i serpini poxvirusa mogu potisnuti signalizaciju kroz receptore smrti u modelima staničnih kultura, ovi proteini imaju sposobnost blokiranja širokog spektra procesa ovisnih o proteazama te se čini da imaju i višestruke funkcije u promicanju virusnog razmnožavanja in vivo.

**Tablica 1.** Virusni proteini i njihov u-inak na apoptozu**Table 1.** Viral proteins and their influence on apoptosis

Virus	Protein	MEHANIZAM INHIBICIJE APOPTOZE/ MECHANISM OF APOPTOSIS INHIBITION	Referenca/ Reference
ADENOVIRUSI/ ADENOVIRUSES	E3 – 10,4	Smanjuje ekspresiju FasR/decreases expression of FasR	48, 49
	E3 – 6,7	Smanjuje ekspresiju TRAIL/decreases expression of TRAIL	50, 51
	E1B – 19K	Zdru`ivanjem s Bax dokida djelovanje TNF $\alpha$ / associates with Bax and inhibits TNF $\alpha$	69, 70
BAKULOVIRUSI/ BACULOVIRUSES	p35, IAP	Supresija kaspaza/caspase suppression	61, 79
CMV	UL – 36	Supresija kaspaza/caspase suppression	59
	UL – 37	Dokida djelovanje Bax-a u mitohondriju/inhibits Bax	68
EBV	BHFR1	Virusni ortolog Bcl-2/ Bcl-2-like protein	73
	LMP-1	Pove}ava ekspresiju stani-nog Bcl-2/increases expression of cellular Bcl-2	72
HBV	Px	Supresija p53/suppression of p53	79
HCV	NS5A	Inhibira prijenos signala putem TNFR1/inhibits TNFR1 signal transmission	58
HIV	Tat	Virusni ortolog Bcl-2 /Bcl-2-like protein	45
HPV-16	E5	Smanjuje stvaranje DISC-a/decreases formation of DISC	56
	E6	Inhibira prijenos signala putem TNFR1/ inhibits TNFR1 signal transmission	57
POXVIRUSI/ POXVIRUSES	CrmA	Inhibicija serpina/inhibition of serpins	60
		Virusni ortolozi TNFR2, dokidaju djelovanje TNF/ TNFR2-like proteins, inhibition of TNF signal	46, 47
<b>MEHANIZAM INDUKCIJE APOPTOZE/ MECHANISMS OF APOPTOSIS INDUCTION</b>			
ADENOVIRUSI/ ADENOVIRUSES	E1A125	Otpu{tanje virusa iz inficirane stanice/viral release from the infected cell	79
HBV	Px	Osjetljivost na TNF/ sensitivity to TNF	76
		Poticanje p53/induction of p53	75, 76
HCV	protein jezgre	Poja-ava TNF-om posredovanu apoptozu/ increases TNF-mediated apoptosis	77
HIV	Nef	Pove}ava ekspresiju TNFR/increased expression of TNFR	43
HIV1/SIV	Tat	Pove}ava ekspresiju FasR/increased expression of FasR	44
HPV-18	E2	Poticanje p53/induction of p53	79

**Legenda**

CMV-citomegalovirus; DISC-kompleks koji inducira smrt, engl. *death inducing signaling complex*); EBV-Epstein-Barr virus; HBV-hepatitis B virus; HCV-hepatitis C virus; HIV-virus humane imunodeficijencije; HPV-humani papiloma virus; TNF-faktor tumorske nekroze; TNFR-receptor za TNF; TRAIL-ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF; TRAIL-R-receptor za TRAIL; SIV-Simian virus imunodeficijencije

**Legend**

CMV-Cytomegalovirus; DISC-Death inducing signaling complex; EBV-Epstein-Barr virus; HBV-Hepatitis B virus; HCV-Hepatitis C virus; HIV- Human immunodeficiency virus; HPV-Human papillomavirus; TNF-Tumor necrosis factor; TNFR-TNF receptor; TRAIL-TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAILR-TRAIL receptor; SIV-Simian immunodeficiency virus

**Mitohondriji kao cilj**

Nakon primitka razli-utih signala za poticanje apoptoze, pro-apoptotiki se ~lanovi Bcl-2 porodice (npr. Bad,

Bid, Bax, Bak) premje{taju iz citoplazme u mitohondrijsku membranu. Na taj na-in, stvaranjem dimera, dovode do otpu{tanja citokroma c u citoplazmu, stvaranja apoptosoma i aktivacije izvr{nih kaspaza. Ovom se putu mogu suprot-

staviti anti-apoptoti-ki ~lanovi Bcl-2 porodice (npr. Bcl-2 i Bcl-XL), najvjerojatnije heterodimerizacijom s pro-apoptoti-kim ~lanovima. Kao {to je ve} spomenuto, vanjski (receptorom posredovani) put mo`e komunicirati s unutar-njim kroz cijepanje Bid-a. Otcijepljeni Bid (tBid, engl. *truncated Bid*) tada ili heterooligomerizira s Bak ili Bax [62, 63] ili homooligomerizira [64] unutar mitohondrijske membrane. Za o~ekivati je da postoji nekoliko primjera virusne inhibicije puta apoptoze ovisnog o mitohondriju. Vi{e onkogenih  $\gamma$ -herpesvirusa kao {to su Epstein-Barr virus (EBV), herpesvirus povezan s Kaposijevim sarkomom (HHV-8) i herpesvirus saimiri nose uputu za kodiranje virusnih ortologa Bcl-2 porodice (vBcl-2), koji su sposobni inhibirati apoptozu [65–67]. Anti-apoptoti-ki protein humanog CMV-a, UL37, virusni je inhibitor apoptoze lokaliziran u mitohondrijima, koji vezanjem za Bax stvara neaktivni oligomer u mitohondrijskoj membrani [68]. Adenovirusni protein E1B-19K inhibira TNF-om posredovanu apoptozu direktnim zdru`ivanjem s Bax te najvjerojatnije remeti funkciju tBid i blokira aktivaciju prokaspaze 9 [69, 70]. EBV proizvodi i anti-apoptoti-ki protein nazvan latentni membranski protein 1 (LMP-1, od engl. *latent membrane protein-1*) koji je va`an za transformaciju rasta B limfocita [71]. LMP-1 djeluje kao konstitutivno aktivni oblik ~lana porodice TNFR, CD40 [72] i mo`e dovesti do pove}ane ekspresije stani-nog Bcl-2 odnosno smanjene osjetljivosti stanica na stani-nu smrt posredovanu receptorima [73]. Nedavna je studija pokazala da HCV glikoprotein E2 pove}ava dugotrajnost HCV infekcije time {to spre~ava apoptozu zara`ene stanice inhibicijom otpu{tanja citokroma c [74].

### Manipulatori stani-nog ciklusa

Za razliku od ve}ine navedenih kategorija, regulatori stani-nog ciklusa sastoje se od podjednagog broja inhibitora i induktora apoptoze. Jedan od primjera je pX protein virusa hepatitisa B (HBV) koji se vezuje na p53. p53 je pro-apoptoti-ki gen koji se nalazi u svim stanicama i poti-e apoptozu aktivacijom kaspaza 9, 8, 7 i 3. Gubitak p53 rezultira imortalizacijom stanice. Vezivanjem na p53, pX regulira stani-ni ciklus odnosno modulira p53-ovisnu apoptozu [75, 76]. Pove}ana proizvodnja pX proteina poti-e apoptozu, za razliku od smanjene proizvodnje koja ju inhibira [75].

### Zaklju~ak

Virusna regulacija programirane stani-ne smrti ili apoptoze je sofisticiran proces. Virusni su kroz povijest pokazali sposobnost manipulacije navedenog puta kroz epidemije kao {to su velike boginje, polio i AIDS. Virus je sposoban relativno jednostavno u}i u stanicu i inhibirati njezinu apoptozu na na~in koji mu dopu{ta dovoljno vremena za razmno`avanje i infekciju drugih stanica. S druge strane, ne s manjom u~inkovito}u, virus mo`e zaraziti stanicu i inducirati njezinu smrt. [irenjem zaraze putem

apoptoti-kih tjele{aca, imunolo{ki odgovor doma}ina svodi se na najmanju mogu}u mjeru. Iako virusi mogu uzrokovati te{ke bolesti i o{te}enja, napredak molekularne biologije otvorio je epohu u kojoj bi se virusni geni mogli iskoristiti za proizvodnju ~itavog niza terapeutika. U tom bi slu~aju brzo-dijele}e stanice u bolesti poput karcinoma bile »napadnute« s apoptoti-kim genima izoliranim iz virusa, dok bi se degenerativne bolesti poput Parkinsonove i Huntingtonove mogle lije~iti s virusnim anti-apoptoti-kim genima. Unato~ tome {to se proces ~ini jednostavnim, pote{ko}e nastaju pri poku{aju ugra|ivanja virusnih gena u ciljane stanice te odre|ivanju razine i vremena njihove ekspresije. Modulacija stani-ne smrti ~ini va`nu komponentu u patogenezi virusne infekcije. Ovim smo ~lankom `eljeli sa`eti glavne mehanizme stani-ne apoptoze i pru`iti primjere na koji na~in virusi i njihovi genski produkti mogu utjecati na taj proces. Daljnja istra`ivanja i karakterizacija mehanizama, koje virusi koriste da bi izmakli imunolo{kom nadzoru, trebala bi u budu}nosti rezultirati razvojem atraktivnih ciljeva za terapijsku intervenciju.

### Literatura

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239–57.
- [2] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: role in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22:8590–607.
- [3] Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258:479–517.
- [4] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770–6.
- [5] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9:459–70.
- [6] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312–16.
- [7] Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10:76–100.
- [8] Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS. Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:94–101.
- [9] Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335:440–2.
- [10] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899–911.
- [11] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369:321–3.
- [12] Chittenden T, Flemington C, Houghton AB et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 1995; 14:5589–96.
- [13] Puthalath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 2002; 9:505–12.

- [14] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. Bcl-2, Bcl-xL sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8:705–11.
- [15] Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, et al. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001; 15:1481–6.
- [16] Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. The combined functions of pro-apoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; 6:1389–99.
- [17] Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, et al. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nature Immunol* 2002; 3:932–39.
- [18] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217–45.
- [19] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94:481–490.
- [20] Hofmann K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1113–28.
- [21] Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:420–430.
- [22] Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17:1675–87.
- [23] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407:789–95.
- [24] Wang J, Watanabe T. Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells. *Int Rev Immunol* 1999; 18:367–79.
- [25] Ju ST, Matsui K, Ozdemirli M. Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int Rev Immunol* 1999; 18:485.
- [26] Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon J, van den Brink M, Yagita H. 2003. Nature's TRAIL-on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18:1–6.
- [27] Benedict CA. 2003. Viruses and the TNF-related cytokines, an evolving battle. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:349–57.
- [28] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42–9.
- [29] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15:2922–33.
- [30] Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 264:687–701.
- [31] Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; 256:19–26.
- [32] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c release and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479–489.
- [33] Benedict CA, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology* 2002; 3:1013–1018.
- [34] Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53:577–628.
- [35] Everett SF, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* 1999; 7:160–5.
- [36] Hardwick JM. Viral Interference with apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9:339–49.
- [37] Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5:105–11.
- [38] Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997; 71:1739–46.
- [39] Teodoro JG, Branton PE. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* 1997; 71:3620–7.
- [40] Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, Adachi A. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int J Mol Med* 1999; 3:527–30.
- [41] Di Rosa F, Barnaba V. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol Rev* 1998; 164:17–27.
- [42] Paroli M, Schiaffella E, Di Rosa F, Barnaba V. Persisting viruses and autoimmunity. *J Neuroimmunol* 2000; 107:201–4.
- [43] Lama J, Ware CF. Human immunodeficiency virus type 1 Nef mediates sustained membrane expression of tumor necrosis factor and the related cytokine LIGHT on activated T cells. *J Virol* 2000; 74:9396–402.
- [44] Li-Weber M, Laur O, Dern K, Krammer PH. T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF- $\kappa$ B. *Eur J Immunol* 2000; 30:661–70.
- [45] McCloskey TW, Ott M, Tribble E et al. Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 1997; 158:1014–19.
- [46] Loparev VN, Parsons JM, Knight i sur. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95:3786–91.
- [47] Saraiva M and Alcamì A. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J Virol* 2001; 75:226–33.
- [48] Shisler J, Yang C, Walter B, Ware C and Gooding L. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J Virol* 1997; 71:8299–306.
- [49] Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL i sur. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 1998; 392:726–30.
- [50] Benedict CA, Norris PS, Prigozy TI i sur. Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. *J Biol Chem* 2001; 276:3270–8.
- [51] Tollefson AE, Toth K, Doronin K et al. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J Virol* 2001; 75:8875–87.
- [52] Thome M, Schneider P, Hofmann K i sur. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; 386:517–21.
- [53] Bertin J, Armstrong RC, Otilie S et al. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; 94:1172–6.
- [54] Hu S, Vincenz C, Buller M and Dixit VM. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272:9621–4.
- [55] Wang GH, Bertin J, Wang, Y i sur. Bovine herpesvirus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. *J Virol* 1997; 71:8928–32.

- [56] Kabsch K and Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 2002; 76:12162–72.
- [57] Filippova M., Song H, Connolly JL, Dermody TS and Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277:21730–9.
- [58] Majumder M, Ghosh AK, Steele R i sur. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* 2002; 294:94–105.
- [59] Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick L, Mocarski ES and Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98:7829–34.
- [60] Ekert PG, Silke J and Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999; 6:1081–6.
- [61] Clem RJ. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 2001; 8:137–43.
- [62] Eskes R, Desagher S, Antonsson B and Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000; 20:929–35.
- [63] Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ and Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000; 7:1166–73.
- [64] Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y et al. tBID homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277:12237–45.
- [65] Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90:8479–83.
- [66] Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional Bcl-2 homologue. *Nat Med* 1997; 3:293–8.
- [67] Nava VE, Cheng EH, Veliuona M, et al. Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human Bcl-2 oncogene. *J Virol* 1997; 71:4118–22.
- [68] Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A et al. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12536–41.
- [69] Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein associates with lamins *in vivo* and its proper localization is required for inhibition of apoptosis. *Oncogene* 1997; 15: 1587–97.
- [70] Perez D, White E, TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B-19K. *Mol Cell* 2000; 6:53–63.
- [71] Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM i sur. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 1996; 16:7098–108.
- [72] Klein E, Teramoto N, Gogolak P, Nagy N, Bjorkholm M. LMP-1, the Epstein-Barr virus-encoded oncogene with a B cell activating mechanism similar to CD40. *Immunol Lett* 1999; 68:147–54.
- [73] Henderson S, Rowe M, Gregory C et al. Induction of Bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107–15.
- [74] Lee SH, Kim YK, Kim CS, et al. E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *J Immunol* 2005; 175:8226–35.
- [75] Chirillo P, Pagano S, Natoli G i sur. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; 94:8162–7.
- [76] Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8744–9.
- [77] Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72:3691–7.
- [78] Barry M i sur. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000; 3781–94.
- [79] O' Brien U. Viruses and apoptosis, *J gen Virol* 1998; 79:1833–45.