

Received: 08.04.2018
Accepted: 21.08.2018
Published: 11.12.2018

Rola antyapoptycznych białek z rodziny Bcl-2 w zakażeniu wirusem grypy typu A

The role of antiapoptotic Bcl-2 family proteins in the infection of influenza A virus

Zbigniew Wyzewski¹, Karolina P. Gregorczyk²

¹Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie

Rodzina Bcl-2 obejmuje białka odpowiedzialne za regulację apoptozy. Wpływ tych czynników na żywotność komórki jest istotny w zakażeniach wirusowych. Antyapoptotyczna aktywność Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w może sprzyjać skutecznej replikacji IAV, utrzymując zakażoną komórkę przy życiu. Bcl-2 odgrywa jednak rolę przeciwwirusową na późnym etapie zakażenia IAV. Ograniczając transport nowo zsyntetyzowanego vRNP z jądra komórkowego do cytozolu, Bcl-2 zapobiega montażowi potomnych wirionów. Ponadto Bcl-2 odpowiada za modyfikację fosforylacji HA IAV i obniżenie zdolności adhezyjnych wirusa. Badania przedkliniczne sugerują zasadność projektowania metod leczniczych opartych na redukcji aktywności lub wewnątrzkomórkowego poziomu Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL i/lub Bcl-w. Antyapoptotyczni reprezentanci rodziny Bcl-2 są przedstawiani jako potencjalne obiekty docelowe terapii anti-IAV prowadzonych z wykorzystaniem substancji, takich jak IL-24, obatoklaks, ABT-199, ABT-263 i ABT-737. W zakażeniach układu nerwowego należałoby rozważyć metody leczenia zwiększające aktywność lub poziom Bcl-2 w neuronach.

Słowa kluczowe:

IAV • rodzina Bcl-2 • apoptoza • terapia przeciwwirusowa

Summary

Bcl-2 family consists proteins responsible for apoptosis regulation. Influence of those factors on the cell viability is essential in the context of viral infections. Antiapoptotic activity of Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w may favor effective replication IAV by keeping infected cell alive. On the other hand, Bcl-2 plays antiviral role at the late stage of IAV infection. Limiting the transport of newly synthesized vRNP from the cell nucleus to cytosol, Bcl-2 prevents effective montage of the progeny virions. Moreover Bcl-2 is responsible for modification of the IAV HA phosphorylation and consequently for decrease in virus adhesive abilities. Preclinical studies suggest that treatment strategies reducing activity or the intracellular level of Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL and/or Bcl-w, should be projected. Antiapoptotic members of Bcl-2 family are described as potential targets of anti-IAV therapies that use substances such as IL-24, obatoclax, ABT-199, ABT-263 and ABT-737. On the other hand, the therapy elevating activity or intraneuronal level of Bcl-2 should be considered in the context of nervous system infections.

Keywords:

IAV • Bcl-2 family • apoptosis • antiviral therapy

GICID	01.3001.0012.7835
DOI:	10.5604/01.3001.0012.7835
Word count:	3032
Tables:	–
Figures:	1
References:	71

Adres autora: dr Zbigniew Wyżewski, Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: zbigniew.wyzewski@gmail.com

Wykaz skrótów: **AAV** – wektor skonstruowany w oparciu o wirusy adenosatelitarne (adeno-associated viruses), **Apaf-1** – czynnik 1 aktywujący proteazy apoptotyczne (apoptotic protease-activating factor-1), **BH** – domenA homologii z Bcl-2 (Bcl-2 homology), **cRNA** – komplementarny RNA (complementary RNA), **GA** – aparat Golgiego (Golgi apparatus), **HA** – hemaglutynina (hemagglutinin), **IAV** – wirus grypy typu A (influenza A virus), **NA** – neuraminidaza (neuraminidase), **NP** – nukleoproteina (nucleoprotein), **OMM** – zewnętrzna błona mitochondrialna (outer mitochondrial membrane), **p38MAPK** – wielofunkcyjna kinaza p38 aktywowana mitogenami (p38 mitogen-activated protein kinase), **RPE** – ludzkie komórki nabłonka barwnikowego siatkówki (retinal pigment epithelium), **siRNA** – mały interferujący RNA (small interfering RNA), **tBid** – skrócona postać Bid (truncated Bid), **UACA** – autoantygen błony naczyniowej zawierający domenę superhelisy i powtórzenia ankyrynowe (uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats), **vRNA** – wirusowy RNA (viral RNA), **vRNP** – wirusowy kompleks rybonukleinowy (viral ribonucleoprotein).

WSTĘP

Przebieg, charakter i częstotliwość zakażeń wirusowych są uzależnione od sieci złożonych interakcji obejmujących struktury czynnika zakaźnego i białka gospodarza. Znajomość tych oddziaływań, ugruntowana i pogłębiona wnikliwymi badaniami naukowymi, inspiruje projekty skutecznych terapii przeciwwirusowych. Rozległa wiedza na temat udziału białek komórkowych w zakażeniach rozmaitymi patogenami łączy zatem wartość poznawczą z potencjałem praktycznym – leczniczym. Rodzina białek Bcl-2 obejmuje czynniki determinujące wrażliwość komórki na apoptotyczną stymulację, przeciwdziałające indukcji apoptozy bądź sprzyjające temu procesowi i promującymi jego inicjację w sposób zależny od mitochondriów. Proporcja między wewnątrzkomórkowym poziomem pro – i antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 może zadecydować o uruchomieniu bądź o zahamowaniu indukcji wewnętrznego szlaku apoptozy [15, 19, 27, 44, 52, 63]. Funkcje regulatorowe przedstawicieli opisywanej grupy białek nabierają szczególnego znaczenia w zakażeniach wirusowych, gdy żywotność zakażonej komórki może np. warunkować dopełnienie cyklu replikacyjnego lub zaistnienie zjawisk istotnych z perspektywy patogenezy nowotworowej o etiologii wirusowej [1, 17, 26, 33, 39, 43, 47, 66, 68].

W artykule opisano rolę antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 w przebiegu zakażeń wywoływanych przez wirus grypy typu A (influenza A virus, IAV). Przedstawiono także potencjalne możliwości terapeutyczne, których zarys wyłania się z testów przedklinicznych

wskazujących Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w jako proponowane obiekty docelowe kuracji anty-IAV oraz z danych literaturowych potwierdzających zależność potencjału apoptotycznego komórki gospodarza od efektywności wirusowej replikacji.

RODZINA BIAŁEK BCL-2

Rodzina Bcl-2 to pro – i antyapoptotyczne czynniki białkowe zaangażowane w regulację mitochondrialnego szlaku indukcji, apoptozy. Według kryterium liczby domen homologii z Bcl-2 (Bcl-2 homology, BH), wyodrębnia się trzy grupy tych białek. Pierwsza z nich gromadzi antyapoptotyczne czynniki regulatorowe mające cztery domeny BH (BH1-4); jej przedstawicielami są: Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w i A1. Druga grupa obejmuje białka zawierające wyłącznie jedną domenę BH, tzw. białka mające „tylko-BH3” (BH3-only proteins): Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf i Hrk. Funkcją tych czynników jest promocja apoptozy. Trzecia grupa białek z rodziny Bcl-2 jest tworzona przez białka zawierające trzy domeny BH (BH1-3). Należą do niej Bax i Bak [45, 49, 60], które w następstwie aktywacji uzyskują zdolność do tworzenia oligomerycznych porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (outer mitochondrial membrane, OMM). Zwiększenie przepuszczalności OMM prowadzi do uwolnienia proapoptotycznych czynników, takich jak cytochrom c, z przestrzeni międzymbłonowej do cytozolu i konsekwentnej aktywacji kaspazy-9 (inicjatorowej) i enzymów efektorowych w ramach wewnętrznego szlaku apoptozy. Antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, m.in. Bcl-2, są odpowiedzialne

za wiązanie i unieczynnianie Bax i Bak, a zatem za ochronę integralności mitochondriów i przeciwdziałanie indukcji programowanej śmierci komórki w sposób zależny od tych organelli [5, 9].

CHARAKTERYSTYKA WIRUSA GRYPY TYPU A

IAV to patogen wielu gatunków zwierząt, występujący u ptaków, fok, norek, świń, koni, psów i – jako czynnik zoonotyczny – zagrażający ludziom. Głównym rezerwuarem wirusa jest ptactwo wodne [29, 42]. Większość IAV jest przyczyną łagodnych zakażeń odzwierzęcych, tym niemniej serotypy, takie jak H1N1, H5N1, H5N6, H10N8 i H7N9 mogą powodować poważne problemy zdrowotne, niekiedy nawet prowadzące do śmierci [4].

Genom IAV ma postać segmentowanego RNA o ujemnej polarności, zwanego wirusowym RNA (viral RNA, vRNA). Każdy z ośmiu segmentów vRNA IAV przyjmuje formę podwójnej helisy i tworzy wirusowy kompleks rybonukleinowy (viral ribonucleoprotein, vRNP) z cząsteczkami nukleoproteiny czynnika zakaźnego (nucleoprotein, NP) i heterotrimeryczną RNA-zależną polimerazą RNA, złożoną z podjednostek PA, PB1 i PB2. Struktury vRNP znajdują się w macierzy otoczonej sferyczną osłonką białkowo-lipidową, wzmocnioną od strony wewnętrznej białkiem M1 i eksponującą na swojej powierzchni hemaglutyninę (hemagglutinin, HA) oraz neuraminidazę (neuraminidase, NA). IAV jest różnicowane na serotypy w oparciu o warianty HA i NA [21, 35, 61, 70].

Wirusowa HA jest strukturą odpowiedzialną za wiązanie kwasu sjałowego glikoprotein lub glikolipidów komórki gospodarza i – w związku z tym – za adhezję wirionu do jej powierzchni. Czynnik zakaźny ulega następnie internalizacji w procesie endocytozy lub rzadziej makropinocytozy [30, 50]. W dalszym przebiegu zakażenia komórki, vRNP jest uwalnianie do cytozolu, a następnie migruje do jądra komórkowego i w jego obrębie ulega replikacji i transkrypcji [35, 61, 70]. Wirusowa polimeraza, złożona z trzech podjednostek – PA, PB1 i PB2, katalizuje syntezę RNA(+), zwanego komplementarnym RNA (complementary RNA, cRNA), w oparciu o segmenty vRNA patogenu [30]. cRNA służy następnie za matrycę do wytwarzania potomnych cząsteczek vRNA. Wirusową polimerazę cechuje brak aktywności korektorskiej, która jest przyczyną bardzo częstego występowania mutacji w genomach potomnych wirionów. Szacuje się, że z jednej zakażonej komórki może się uwolnić około 10000 mutantów IAV, co sprawia, że walka z patogenem jest bardzo kłopotliwa i jest dużym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Nowo powstałe vRNA może odgrywać rolę matrycy w procesach transkrypcji i dalszej replikacji bądź też opuścić jądro komórkowe w kompleksie z białkami wirusowymi (jako vRNP) [2], a następnie utworzyć wiriony potomne przez nabycie osłonki lipidowo-białkowej, w procesie tzw. „pączkowania” [48].

ANTYAPOPTOTYCZNA ROLA BIAŁEK MCL-1, BCL-2, BCL-XL I BCL-W WE Wczesnym ETAPIE ZAKAŻENIA IAV

Mcl-1 jest antyapoptotycznym przedstawicielem rodziny Bcl-2, pozostającym w antagonistycznych relacjach z czynnikami promującymi apoptozę, należącymi do grupy białek zawierających trzy domeny BH [58]. Mcl-1 odgrywa rolę bezpośredniego inhibitora Bax i Bak [16], oddziałując ze skróconą postacią Bid (truncated Bid, tBid) [6]. Germain i wsp. [16] w badaniach na ludzkich komórkach linii HeLa, transfekowanych wektorem kodującym Mcl-1, wykazali hamujący wpływ tego białka na translokację Bax do mitochondrium, a także – co się z tym wiąże – na zjawisko uwalniania cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej [16]. Weiss i wsp. [62] podjęli próbę scharakteryzowania roli Mcl-1 w zakażeniu IAV, wykorzystując do badań komórki nabłonkowe nerki koczodana zielonego linii Vero. Zgodnie z przewidywaniami, wyciszenie ekspresji genu kodującego Mcl-1 podnosiło potencjał apoptotyczny komórek do poziomu, przy którym zakażenie IAV spowodowało aktywację kaspazy-3. Dalsze badania zespołu pozwoliły ustalić wpływ deficytu Mcl-1 na istotny spadek wirusowego miana. Na podstawie uzyskanych wyników, Mcl-1 może wykazywać aktywność prowirusową jako białko opóźniające śmierć zakażonej komórki i – w związku z powyższym – umożliwiające wirusowi przeprowadzenie pełnego cyklu replikacyjnego. Otrzymane rezultaty badań przemawiają za ukierunkowaniem terapii przeciwwirusowych na przedwczesną – z perspektywy zakażenia wirusowego – indukcję apoptozy [62].

Rola Bcl-2, jako antyapoptotycznego przedstawiciela rodziny Bcl-2, w przebiegu wewnątrzkomórkowego zakażenia IAV jest niejednoznaczna i zrelatywowana do etapu cyklu replikacyjnego wirusa. Przyspieszona apoptoza wiąże się z przerwaniem replikacji w jej wczesnym okresie; zbyt duża żywotność komórki (zahamowana apoptoza) – wpływa na wewnątrzkomórkową dystrybucję vRNP i uniemożliwia efektywny montaż potomnych wirionów [20, 32, 48].

Bcl-2 oraz Bcl-xL i Bcl-w, podobnie jak Mcl-1, mogą sprzyjać skutecznej replikacji na wczesnym etapie zakażenia, odgrywając rolę czynników opóźniających apoptozę do czasu zsyntetyzowania potomnych kompleksów vRNP w jądrze komórkowym. Badania Kakkoli i wsp. [20] na ludzkich komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki (retinal pigment epithelium, RPE) sugerują, że interakcje antyapoptotycznych białek Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w z proapoptycznymi czynnikami Bax, Bad i autoantygenem błony naczyniowej zawierającym domenę superhelisy i powtórzenia ankyrynowe (uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats, UACA), promują zakażenie wirusowe, przeciwdziałając permeabilizacji mitochondriów, uwolnieniu cytochromu c do cytozolu i aktywacji kaskady apoptotycznych kaspaz na wczesnym etapie cyklu replikacyjnego [20].

WPLYW BIAŁKA BCL-2 NA EKSPORT VRNP Z JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Jednym z istotnych etapów wirusowego cyklu replikacyjnego jest uwalnianie vRNP z jądra komórkowego do cytozolu. Bcl-2 jest odpowiedzialne za zjawisko ograniczenia transportu nowo utworzonego vRNP z jądra komórkowego do cytoplazmy zakażonych komórek. Mechanizm wyjaśniający opisaną zależność nie został jednoznacznie scharakteryzowany [32, 48]. Według jednej z hipotez, przeciwwirusowe właściwości Bcl-2 wynikają z antagonizmu tego białka innego przedstawiciela rodziny Bcl-2 – proapoptotycznego czynnika Bax; odgrywa on istotną rolę w promocji zakażenia IAV [32]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że wirus wywołuje apoptozę zakażonych komórek [28, 34, 38, 51, 57]. Powyższa strategia sprzyja replikacji wirusowej i – w skali ogólnoustrojowej – odpowiada za skuteczne rozprzestrzenianie się zakażenia i za wystąpienie charakterystycznych objawów grypy, takich jak limfopenia oraz stany zapalne płuc i dróg oddechowych. IAV jest czynnikiem zakaźnym wywołującym apoptozę zarówno komórek nabłonkowych, jak i komórek układu odpornościowego – limfocytów i komórek żernych. Apoptotyczna śmierć towarzysząca zakażeniu powoduje uszkodzenie tkanek gospodarza i przyczynia się do rozwinięcia stanu zapalnego [3, 31, 32]. W związku z powyższym, znajomość roli białka Bax w regulacji apoptozy w przebiegu cyklu replikacyjnego IAV, może być wykorzystana w projektowaniu terapii przeciwwirusowych. Badania McLeana i wsp. [32] dowiodły, że proapoptotyczny przedstawiciel rodziny Bcl-2 ma podstawowe znaczenie dla efektywności wewnątrzkomórkowego zakażenia. Mysie fibroblasty płodowe z unieczynnionym genem kodującym Bax wykazywały zwiększoną żywotność, w porównaniu do komórek niepoddanych wspomnianej modyfikacji. Wobec deficytu Bax zakażenie wirusowe nie powodowało indukcji apoptozy i aktywacji kaspaz efektorowych, co wpływało na zahamowanie wytwarzania IAV. Śmierć fibroblastów z unieczynnionym genem kodującym białko Bax zachodziła w procesie autofagii. Sprawne i efektywne składanie wirionów potomnych było uniemożliwione ze względu na akumulację vRNP w jądrze komórkowym [32]. Opisanie badania są zgodne z pracą Wurzera i wsp. [64], opisującą zależność między aktywnością kaspazy-3 a wewnątrzkomórkową dystrybucją vRNP IAV. Unieczynnienie proapoptotycznego enzymu efektorowego z użyciem inhibitora, Z-DEVD-FMK, lub obniżenie poziomu syntezy kaspazy-3 z wykorzystaniem małego interferującego RNA (small interfering RNA, siRNA) w istotny sposób zakłócało wirusową replikację. Badania tego zespołu wykazały, że obecność Z-DEVD-FMK (40 μ M) w płynie hodowlanym w 4-24 h zakażenia IAV komórek nabłonkowych nerki psa linii MDCK, powodowała obniżenie miana czynnika zakaźnego prawie do 30% poziomu obserwowanego w próbie kontrolnej, w której zakażone komórki były inkubowane w medium bez inhibitora. Dalsze eksperymenty wykazały, że w ludzkich komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych linii A549, unieczynnienie genu kodującego kaspazę-3 wpływa

na wewnątrzkomórkową dystrybucję vRNP podczas zakażenia IAV. W komórkach z nieaktywnym genem proapoptotycznego enzymu zaobserwowano akumulację vRNP w jądrze komórkowym, co przemawiało za udziałem kaspazy-3 w transporcie vRNP do cytozolu, a więc za istotną rolę enzymatycznego białka w skutecznym przebiegu wirusowego cyklu replikacyjnego [64]. Czynniki Bax, jako białko uruchamiające wewnętrzny szlak indukcji apoptozy i – w związku z tym – pośrednio powodujące aktywację kaspazy-3, odpowiada za cytozolowe umiejscowienie vRNP i efektywne składanie potomnych wirionów IAV [32].

Tymczasem Bcl-2 może wiązać Bax, przeciwdziałając jego homooligomeryzacji, zapobiegając powstawaniu porów zwiększających przepuszczalność OMM i powstrzymując sekwencję zdarzeń prowadzących do aktywacji kaspazy-3. Badania wykazały, że oddziaływanie na linii Bcl-2-Bax zachodzą między rowkiem uformowanym z domen BH1-3 Bcl-2 a regionem BH3 Bax. Ponadto w antagonistyczne interakcje Bcl-2-Bax mogą być zaangażowane obszar BH4 Bcl-2 i heliks 6 Bax [14].

Na podstawie innej hipotezy, Bcl-2 ogranicza uwalnianie vRNP z jądra komórkowego do cytozolu jako substrat wielofunkcyjnej kinazy p38 aktywowanej mitogenami (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) [8, 35], czynnika uczestniczącego w eksporcie vRNP z jądra komórkowego. W komórkach zakażonych IAV, p38MAPK jest zaangażowany w fosforylację białka Bcl-2. Modyfikacji ulegają dwie reszty aminokwasowe Bcl-2 – serynowa i treoninowa, występujące odpowiednio w pozycjach 56 i 87. Fosforylacja ogranicza antyapoptotyczną aktywność Bcl-2, dostosowując żywotność komórki do potrzeb czynnika zakaźnego i promując apoptozę potrzebną do uwolnienia i rozprzestrzenienia potomnych wirionów. Zaangażowanie p38MAPK w unieczynnianie Bcl-2 wpływa jednak na zmniejszenie podaży kinazy w jądrze komórkowym i przyczynia się do niedoboru cząsteczek enzymu ukierunkowanych na udział w transporcie vRNP z kompartmentu jądrowego do cytozolu zakażonej komórki [35]. Bcl-2 odpowiada za obniżenie efektywności replikacji IAV i istotny spadek wirusowego miana [35, 69]. Nencioni i wsp. [35] odkryli istotną zależność między poziomem Bcl-2 a dystrybucją p38MAPK w komórkach zakażonych IAV. W komórkach linii MDCK, w których nie było konstytutywnej biosyntezy Bcl-2, p38MAPK gromadziło się w jądrze komórkowym. Tymczasem w komórkach ludzkiego nerwiaka zarodkowego linii SH-SY5Y, odznaczających się dużym wytwarzaniem Bcl-2, jak również w komórkach linii MDCK poddanych stabilnej transfekcji wektorem kodującym to białko (MDCKBcl-2), p38MAPK występowało głównie w cytozolu, w postaci związanej z Bcl-2. W przebiegu dalszych badań na zakażonych komórkach linii SH-SY5Y, ekspresja genu kodującego Bcl-2 została wyciszona z wykorzystaniem siRNA, co spowodowało zwiększenie poziomu vRNP w cytozolu

i ponadtrzykrotny wzrost wirusowego miana [35]. Wyniki były zgodne z wcześniejszą pracą zespołu, opisującą ujemny wpływ Bcl-2 na zjawisko uwalniania vRNP z jądra komórkowego do cytoplazmatycznych miejsc montażu potomnych wirionów IAV [36].

WPLYW BIAŁKA BCL-2 NA GLIKOZYLACJĘ HA IAV

Wczesne badania Olsena i wsp. [40] dowiodły roli białka Bcl-2 w modyfikacji procesu glikozylacji HA IAV, białka odpowiedzialnego za adhezję wirionu do komórki gospodarza [40]. HA jest syntetyzowane w postaci prekursora – HA0, który ulega proteolitycznemu cięciu na dwie cząsteczki – HA1 i HA2, obecne na powierzchni wirusowej osłonki i warunkujące zakaźność IAV. Proteoliza zachodzi w aparacie Golgiego (Golgi apparatus, GA) od strony *trans* organellum, z udziałem furyny lub proteazy PC6. W sieci cystern GA odbywa się również glikozylacja HA1 i HA2 [40, 71]. Olsen i wsp. [40] – w badaniach nad rolą Bcl-2 w zakażeniu IAV – zaobserwowali, że zarówno masa cząsteczkowa HA1, jak i HA2, jest niższa w komórkach MDCKBcl-2 niż w próbie kontrolnej (w komórkach MDCK niepoddanych transfekcji wektorem kodującym Bcl-2). Powyższe różnice w wielkości molekuł zniwelowano, traktując badane białka N-glikozydazą. Wyniki sugerowały wpływ białka Bcl-2 na glikozylację HA i w konsekwencji – na zdolności adhezyjne nowo powstałych cząstek wirusowych i skuteczne rozprzestrzenianie się zakażenia IAV w skali ogólnoustrojowej. Modyfikacja glikozylacji HA istotnie ograniczyła rozprzestrzenianie się IAV w hodowli komórkowej [40].

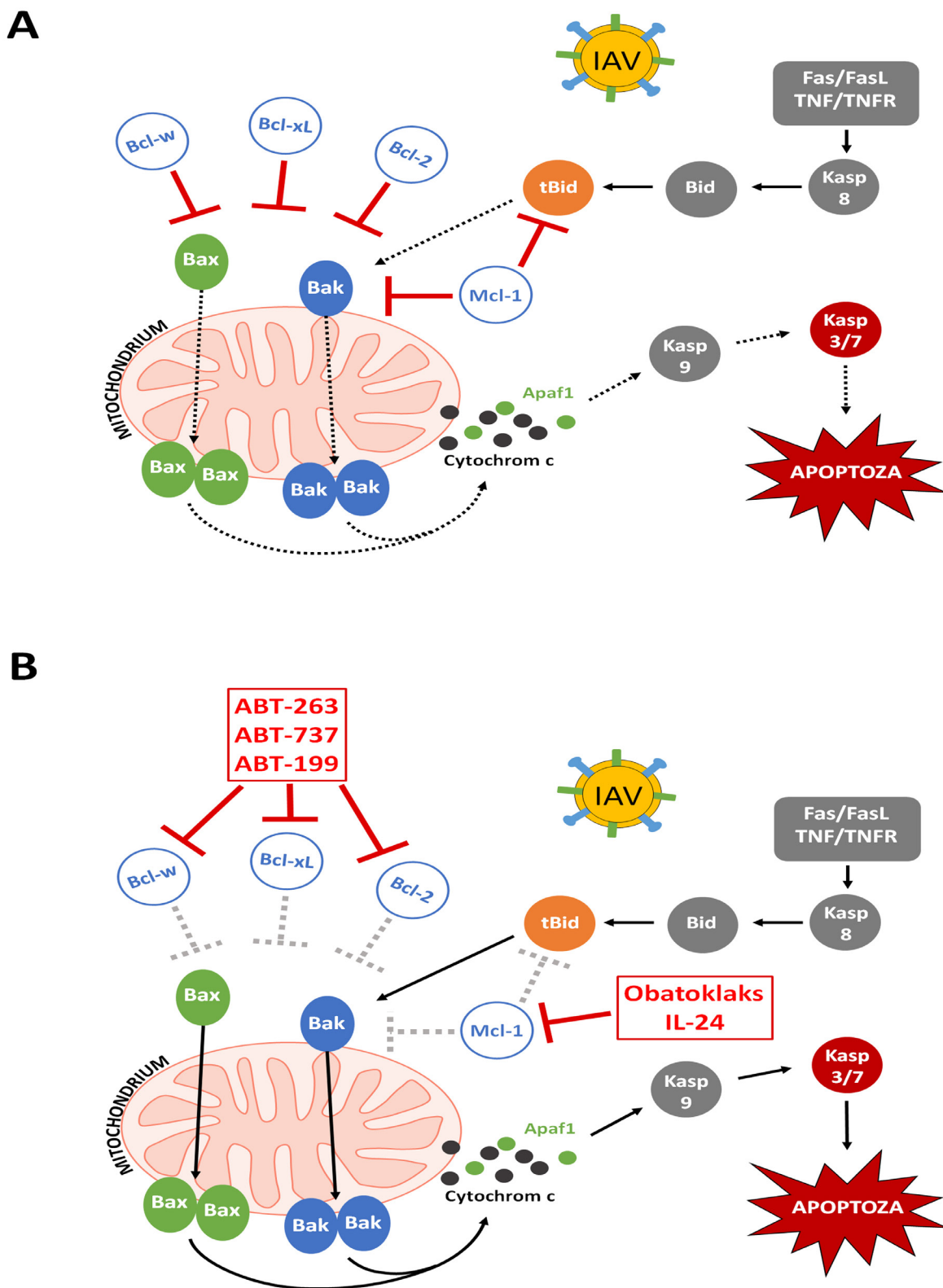
MOŻLIWE IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE ROLI BCL-2 I MCL-1 W ZAKAŻENIU IAV

Weiss i wsp. [62] opisali prowirusową aktywność białka Mcl-1 jako czynnika podnoszącego żywotność zakażonej komórki do poziomu sprzyjającego skutecznej replikacji wirusowej. Jednocześnie zaproponowali wykorzystanie interleukiny-24 (interleukin, IL-24) w terapii zakażenia IAV [61]. IL-24, cytokina należąca do superrodziny IL-10, to białko o dużym potencjale terapeutycznym. Proapoptyczna aktywność IL-24 determinuje jej właściwości przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe [7, 10, 61, 62]. Dash i wsp. [11] przeanalizowali wpływ IL-24 na potencjał apoptotyczny komórek raka stercza, odkrywając zdolność badanej cytokiny do indukcji stresu siateczki śródplazmatycznej (endoplasmic reticulum stress, ERS). Wystąpienie zjawiska ERS hamowało ekspresję genu kodującego Mcl-1 na etapie translacji i kierowało komórki na drogę apoptozy. Związek między deficytem Mcl-1 a proapoptycznym działaniem IL-24 potwierdzono, wykonując transfekcję komórek wektorem kodującym Mcl-1. Badanie dowiodło, że nadmierne wywarzanie Mcl-1 przeciwdziała apoptozie wywołanej przez IL-24 [11]. Powyższe obserwacje są zgodne z badaniami Weissa i wsp. [62]. Wykazali oni wpływ IL-24 na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu Mcl-1 w komórkach linii Vero zakażonych IAV i powiązali to z przeciwwirusową aktywnością badanej cytokiny [62].

Mcl-1 został również zaproponowany jako obiekt docelowy terapii anti-IAV przez Denisovą i wsp. [13]. Zespół poddał analizom przedklinicznym działanie obatoklaksu [13], substancji hamującej aktywność antyapoptycznych białek z rodziny Bcl-2 i stanowiącej przedmiot pogłębionych badań z onkologii [22, 41, 46, 65]. Badania Denisovej i wsp. [13] wykazały, że związek ten skutecznie przeciwdziała replikacji IAV w hodowlach *in vitro* makrofagów i komórek linii RPE. Zespół zaobserwował również wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Mcl-1 na wczesnym etapie infekcji oraz dowiódł, iż częściowe wyciszenie ekspresji genu kodującego Mcl-1 obniża żywotność zakażonych komórek i wpływa na zmniejszenie efektywności zakażenia [13]. Wyniki tych badań nabierają istotnego znaczenia w zestawieniu z pracą Nguyena i wsp. [37]. Wykazali oni, że obatoklaks łączy się z antyapoptycznymi przedstawicielami rodziny Bcl-2, w tym preferencyjnie z białkiem Mcl-1 (ryc.1), najprawdopodobniej zajmując fragment kieszeni hydrofobowej w obrębie rowka wiążącego BH3. W świetle wykonanych analiz, interakcje Mcl-1 z eksperymentalną substancją leczniczą zapobiegają powstawaniu kompleksów Mcl-1-Bak i przeciwdziałają hamowaniu wewnętrznego szlaku apoptozy [37], co kwalifikuje obatoklaks do badań przedklinicznych nad możliwościami udoskonalenia terapii IAV [13, 62].

Potencjalnymi obiektami terapii anti-IAV są również inne antyapoptyczne białka z rodziny Bcl-2: Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w. W oparciu o badania na komórkach linii RPE, Kakkola i wsp. [20] zaproponowali model mechanizmu odpowiadającego za aktywność przeciwwirusową eksperymentalnych substancji leczniczych – czynników ABT-263, ABT-199 i ABT-737 [20], o udokumentowanych właściwościach proapoptycznych (ryc.1) i przeciwnowotworowych [12, 55, 56, 59]. Zgodnie z przedstawionym schematem, leki te wiążą się z Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w na wczesnym etapie zakażenia IAV, obniżając ich powinowactwo do Bax, Bad i UACA. Nieaktywne kompleksy antagonistycznych białek ulegają rozpadowi z uwolnieniem Bad i Bax, promujących indukcję wewnętrznego szlaku apoptozy. Dochodzi do zakłócenia ciągłości OMM i przemieszczenia proapoptycznych czynników z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytozolu zakażonej komórki. Cząsteczki cytochromu c, czynnika 1 aktywnego proteazy apoptotyczne (apoptotic protease-activating factor-1, Apaf-1) i UACA organizują się w apoptosom, rekrutujący i aktywujący kaspazę-9, a w związku z tym zapoczątkowujący kaskadę kaspaz prowadzącą do śmierci komórki [20]. Kakkola i wsp. [20] zaobserwowali, że ABT-263 – powodując nasilenie dysocjacji Bax, Bad i UACA od Bcl-xL i intensyfikację aktywacji kaspazy-9, -3, -7 i -8 – zakłóca metabolizm i funkcje zakażonej komórki w stopniu prowadzącym do zahamowania syntezy mRNA i białek IAV [20].

W późnym etapie zakażenia IAV, Bcl-2 ujawnia właściwości przeciwwirusowe, co przemawia za ukierunkowaniem terapii anti-IAV na zwiększanie aktywności tego białka. Niejednoznaczna rola Bcl-2 w zakażeniu IAV wskazuje



Ryc. 1. Działanie leków anti-IAV; **A** – antyapoptyczne białka z rodziny Bcl-2 unieczynnijają Bax i Bak, opóźniając indukcję wewnętrznego szlaku apoptozy w przebiegu zakażenia IAV. **B** – ABT-263, ABT-737 i ABT-199 hamują antyapoptyczną aktywność Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w, sprzyjając aktywacji Bax i Bak. Obatoklaks wiąże się z Mcl-1, przeciwdziałając unieczynnieniu tBid i zapobiegając utworzeniu się kompleksu Mcl-1-Bak. Przyspieszona apoptoza zakażonej komórki przerywa wirusowy cykl replikacyjny

na możliwość wykorzystania go do zwalczania infekcji układu nerwowego [35]. Udokumentowany neurotropizm IAV sprawia, że zakażenie może się rozprzestrzeniać do mózgu gospodarza i powodować problemy neuropsychiatryczne. Infekcja szczepem H5N1 IAV niesie ryzyko poważnych uszkodzeń układu nerwowego [23, 35, 54]. Wirus ten został scharakteryzowany jako czynnik etiologiczny zapalenia mózgu i krwotoków wewnątrzmoźgowych [54]. Neurony charakteryzują się stosunkowo małą wrażliwością na zakażenie IAV, co może się wiązać z wysokim poziomem Bcl-2 w tych komórkach [25, 35, 36]. Nencioni i wsp. [35] sugerują, że uszkodzenie tkanki nerwowej w patogenezie chorób układu nerwowego o etiologii wirusowej – związanej z IAV, wynika z unieczynnienia Bcl-2 w procesie fosforylacji zależnej od p38MAPK. W tych okolicznościach, białko Bcl-2 odpowiada za redukcję transportu nowo zsyntetyzowanego vRNP z jądra komórkowego do cytozolu i przez to ograniczenie montażu potomnych wirionów, jednak nie zapobiega apoptozie neuronów. Być może należałoby rozważyć zwalczanie zakażeń układu nerwowego IAV ukierunkowane na podniesienie żywotności komórek nerwowych przez ograniczenie aktywności p38MAPK [35]. Ponadto wiele badań poświęcono zagadnieniu skutecznego przeciwdziałania poniedokrwiennym lub pourazowym uszkodzeniom układu nerwowego z zastosowaniem terapii genowych zwiększających poziom Bcl-2 w neuronach. W eksperymentach wykorzystano różnorodne wektory – adenowirusowy [67], herpeswirusowy [18, 24] oraz wektor skonstruowany w oparciu o wirusy adenosatelitarne (adeno-associated viruses, AAV) [53], uzyskując obiecujące rezultaty w zwiększaniu żywotności komórek nerwowych. Niewykluczone, że podobna strategia byłaby skuteczna w próbach złagodzenia przebiegu i objawów zakażenia mózgu IAV.

PODSUMOWANIE

Badania nad aktywnością Bcl-2 i Mcl-1 nabierają szczególnego znaczenia w projektowaniu terapii anti-IAV. Umiarkowany potencjał apoptotyczny zakażonej komórki – utrzymujący się na poziomie, przy którym jej żywotność jest zharmonizowana z cyklem replikacyjnym IAV – warunkuje efektywność wirusowej infekcji. Opisywane mechanizmy anti-IAV opierają się na indukcji apoptozy na wczesnym etapie zakażenia i eliminacji patogenu wraz ze środowiskiem jego replikacji; jednak badania sugerują powiązanie kaskady kaspaz z transportem vRNP do cytozolu, a więc – ze zjawiskiem poprzedzającym i determinującym skuteczny montaż potomnych wirionów. Rola antyapoptycznych białek z rodziny Bcl-2 w infekcji IAV jest zatem niejednoznaczna. W zależności od etapu cyklu replikacyjnego, apoptoza może przeciwdziałać zakażeniu lub przeciwnie – odpowiadać za jego promocję. Strategie proponowanych terapii przeciwwirusowych, przedstawione w artykule, opierają się na modyfikacji wewnątrzkomórkowego poziomu i aktywności białkowych regulatorów apoptozy. Unieczynnienie Bcl-2, Bcl-xL i Bcl-w z użyciem ABT-263, ABT199 lub ABT-737, a także zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu lub zahamowanie aktywności Mcl-1, wykonane odpowiednio z wykorzystaniem IL-24 lub obatoklaksu, może prowadzić do przedwczesnej apoptozy i przzerwania cyklu replikacyjnego IAV. Jednak badania dowodzą również przeciwwirusowej roli Bcl-2 na późnym etapie zakażenia. Antyapoptyczne właściwości Bcl-2 mogą sprzyjać ograniczeniu uszkodzeń tkanki nerwowej podczas infekcji mózgu, co – w tym kontekście – przemawiałoby za skutecznością strategii terapeutycznej opartej na zwiększeniu aktywności lub wewnątrzkomórkowego poziomu białka Bcl-2.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aguirre-Hernández C., Maya-Pineda H., Millán J.S., Man Y.K., Lu Y.J., Halldén G.: Sensitisation to mitoxantrone-induced apoptosis by the oncolytic adenovirus Ad $\Delta\Delta$ through Bcl-2-dependent attenuation of autophagy. *Oncogenesis*, 2018; 7: 6
- [2] Boivin S., Cusack S., Ruigrok R.W., Hart D.J.: Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 28411-28417
- [3] Brydon E.W., Morris S.J., Sweet C.: Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005; 29: 837-850
- [4] Bui C.M., Chughtai A.A., Adam D.C., MacIntyre C.R.: An overview of the epidemiology and emergence of influenza A infection in humans over time. *Arch. Public Health*, 2017; 75: 15
- [5] Chen H.C., Kanai M., Inoue-Yamauchi A., Tu H.C., Huang Y., Ren D., Kim H., Takeda S., Reyna D.E., Chan P.M., Ganesan Y.T., Liao C.P., Gavathiotis E., Hsieh J.J., Cheng E.H.: An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat. Cell Biol.*, 2015; 17: 1270-1281
- [6] Clohessy J.G., Zhuang J., de Boer J., Gil-Gómez G., Brady H.J.: Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 5750-5759
- [7] Commins S., Steinke J.W., Borish L.: The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008; 121: 1108-1111
- [8] Cuenda A., Rousseau S.: p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1773: 1358-1375
- [9] Dai H., Pang Y.P., Ramirez-Alvarado M., Kaufmann S.H.: Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 89-99
- [10] Dash R., Bhutia S.K., Azab B., Su Z.Z., Quinn B.A., Kegelmen T.P., Das S.K., Kim K., Lee S.G., Park M.A., Yacoub A., Rahmani M., Emdad L., Dmitriev I.P., Wang X.Y. i wsp.: Mda-7/IL-24: a unique member of the IL-10 gene family promoting cancer-targeted toxicity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010; 21: 381-391
- [11] Dash R., Richards J.E., Su Z.Z., Bhutia S.K., Azab B., Rahmani M., Dasmahapatra G., Yacoub A., Dent P., Dmitriev I.P., Curiel D.T., Grant S., Pellicchia M., Reed J.C., Sarkar D., Fisher P.B.: Mechanism by which Mcl-1 regulates cancer specific apoptosis triggered by mda-7/IL-24, an IL-10-related cytokine. *Cancer Res.*, 2010; 70: 5034-5045
- [12] De Wolf E., De Wolf C., Richardson A.: ABT-737 and pictilisib synergistically enhance pitavastatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Oncol. Lett.*, 2018; 15: 1979-1984

- [13] Denisova O.V., Kakkola L., Feng L., Stenman J., Nagaraj A., Lampe J., Yadav B., Aittokallio T., Kaukinen P., Ahola T., Kuivanen S., Vapalahti O., Kantele A., Tynell J., Julkunen I. i wsp.: Obatoclox, saliphenylhalamide, and gemcitabine inhibit influenza A virus infection. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 35324-35332
- [14] Ding J., Zhang Z., Roberts G.J., Falcone M., Miao Y., Shao Y., Zhang X.C., Andrews D.W., Lin J.: Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 28749-28763
- [15] Fan X., Wang P., Sun Y., Jiang J., Du H., Wang Z., Duan Z., Lei H., Li H.: Induction of apoptosis by an oleonic acid derivative in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells is associated with mitochondrial dysfunction. *Oncol. Lett.*, 2018; 15: 2821-2828
- [16] Germain M., Milburn J., Duronio V.: MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX interaction. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 6384-6392
- [17] Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F., Longnecker R., Kieff E., Rickinson A.: Induction of Bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, 1991; 65: 1107-1115
- [18] Howard S., Bottino C., Brooke S., Cheng E., Giffard R.G., Sapolsky R.: Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. *J. Neurochem.*, 2002; 83: 914-923
- [19] Hu C., Huang S., Wu F., Ding H.: miR-98 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting MAPK6 in HUVECs. *Exp. Ther. Med.*, 2018; 15: 2755-2760
- [20] Kakkola L., Denisova O.V., Tynell J., Viiliäinen J., Ysenbaert T., Matos R.C., Nagaraj A., Ohman T., Kuivanen S., Paavilainen H., Feng L., Yadav B., Julkunen I., Vapalahti O., Hukkanen V. i wsp.: Anticancer compound ABT-263 accelerates apoptosis in virus-infected cells and imbalances cytokine production and lowers survival rates of infected mice. *Cell Death Dis.*, 2013; 4: e742
- [21] Koçer Z.A., Fan Y., Huether R., Obenauer J., Webby R.J., Zhang J., Webster R.G., Wu G.: Survival analysis of infected mice reveals pathogenic variations in the genome of avian H1N1 viruses. *Sci. Rep.*, 2014; 4: 7455
- [22] Konopleva M., Watt J., Contractor R., Tsao T., Harris D., Estrov Z., Bornmann W., Kantarjian H., Viallet J., Samudio I., Andreeff M.: Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclox). *Cancer Res.*, 2008; 68: 3413-3420
- [23] Kristensson K.: Avian influenza and the brain – comments on the occasion of resurrection of the Spanish flu virus. *Brain Res. Bull.*, 2006; 68: 406-413
- [24] Lawrence M.S., McLaughlin J.R., Sun G.H., Ho D.Y., McIntosh L., Kunis D.M., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.: Herpes simplex viral vectors expressing Bcl-2 are neuroprotective when delivered after a stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1997; 17: 740-744
- [25] Levine B., Huang Q., Isaacs J.T., Reed J.C., Griffin D.E., Hardwick J.M.: Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the Bcl-2 cellular oncogene. *Nature*, 1993; 361: 739-742
- [26] Lima M.A., Ferreira M.V., Barros M.A., Pardini M.I., Ferrasi A.C., Mota R.M., Rabenhorst S.H.: Relationship between EBV infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2, and Bax in gastric carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2008; 17: 82-89
- [27] Lombardi V.R., Carrera I., Cacabelos R.: In vitro and in vivo cytotoxic effect of AntiGan against tumor cells. *Exp. Ther. Med.*, 2018; 15: 2547-2556
- [28] Lowy R.J.: Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *Int. Rev. Immunol.*, 2003; 22: 425-449
- [29] Ma W., Kahn R.E., Richt J.A.: The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. *J. Mol. Genet. Med.*, 2009; 3: 158-166
- [30] Matsuoka Y., Matsumae H., Katoh M., Einfeld A.J., Neumann G., Hase T., Ghosh S., Shoemaker J.E., Lopes T.J., Watanabe T., Watanabe S., Fukuyama S., Kitano H., Kawaoka Y.: A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst. Biol.*, 2013; 7: 97
- [31] McLean J.E., Datan E., Matassov D., Zakeri Z.F.: Lack of Bax prevents influenza A virus-induced apoptosis and causes diminished viral replication. *J. Virol.*, 2009; 83: 8233-8246
- [32] McLean J. E., Ruck A., Shirazian A, Pooyaei-Mehr F, Zakeri Z.F.: Viral manipulation of cell death. *Curr. Pharm. Des.*, 2008; 14: 198-220
- [33] Millan M.T., Natkunam Y., Clarke-Katzenberg R., Desai D., Prapong W., So S.K., Esquivel C.O., Sibley R., Ferran C., Martinez O.M.: Epstein-Barr virus infection is associated with endothelial Bcl-2 expression in transplant liver allografts. *Transplantation*, 2002; 73: 465-469
- [34] Mori I., Komatsu T., Takeuchi K., Nakakuki K., Sudo M., Kimura Y.: In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J. Gen. Virol.*, 1995; 76: 2869-2873
- [35] Nencioni L., De Chiara G., Sgarbanti R., Amatore D., Aquilano K., Marocchi M.E., Serafino A., Torcia M., Cozzolino F., Ciriolo M.R., Garaci E., Palamara A.T.: Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 16004-16015
- [36] Nencioni L., Iuvara A., Aquilano K., Ciriolo M.R., Cozzolino F., Rotilio G., Garaci E., Palamara A.T.: Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. *FASEB J.*, 2003; 17: 758-760
- [37] Nguyen M., Marcellus R.C., Roulston A., Watson M., Serfass L., Murthy Madiraju S.R., Goulet D., Viallet J., Bélec L., Billot X., Acoca S., Purisima E., Wiegman A., Cluse L., Johnstone R.W., Beauparlant P., Shore G.C.: Small molecule obatoclox (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19512-19517
- [38] Nichols J.E., Niles J.A., Roberts N.J.Jr.: Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J. Virol.*, 2001; 75: 5921-5929
- [39] Oh J.M., Kim S.H., Cho E.A., Song Y.S., Kim W.H., Juhnn Y.S.: Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 402-410
- [40] Olsen C.W., Kehren J.C., Dybdahl-Sissoko N.R., Hinshaw V.S.: Bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *J. Virol.*, 1996; 70: 663-666
- [41] Or C.R., Chang Y., Lin W.C., Lee W.C., Su H.L., Cheung M.W., Huang C.P., Ho C., Chang C.C.: Obatoclox, a pan-BCL-2 inhibitor, targets cyclin D1 for degradation to induce antiproliferation in human colorectal carcinoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016; 18: E44
- [42] Parrish C.R., Murcia P.R., Holmes E.C.: Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans. *J. Virol.*, 2015; 89: 2990-2994
- [43] Qu Y., Liu L., Niu Y., Qu Y., Li N., Sun W., Lv C., Wang P., Zhang G., Liu S.: Viral proliferation and expression of tumor-related gene in different chicken embryo fibroblasts infected with different tumorigenic phenotypes of avian leukosis virus subgroup J. *Poult. Sci.*, 2016; 95: 2383-2390
- [44] Qu Y.B., Liao Z.X., Liu C., Wang X.Z., Zhang J.: EFLDO induces apoptosis in hepatic cancer cells by caspase activation in vitro and suppresses tumor growth in vivo. *Biomed. Pharmacother.*, 2018; 100: 407-416
- [45] Raemy E., Martinou J.C.: Involvement of cardiolipin in tBid-induced activation of BAX during apoptosis. *Chem. Phys Lipids*, 2014; 179: 70-74
- [46] Rahmani M., Aust M.M., Attkisson E., Williams D.C.Jr., Ferreira-Gonzalez A., Grant S.: Inhibition of Bcl-2 antiapoptotic members by obatoclox potentially enhances sorafenib-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a Bim-dependent process. *Blood*, 2012; 119: 6089-6098

- [47] Reyes R.A., Cockerell G.L.: Increased ratio of bcl-2/bax expression is associated with bovine leukemia virus-induced leukemogenesis in cattle. *Virology*, 1998; 242: 184-192
- [48] Rossman J.S., Lamb R.A.: Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 2011; 411: 229-236
- [49] Roy M.J., Vom A., Czabotar P.E., Lessene G.: Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 2014; 171: 1973-1987
- [50] Samji T.: Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale J. Biol. Med.*, 2009; 82: 153-159
- [51] Schultz-Cherry S., Krug R.M., Hinshaw V.S.: Induction of apoptosis by influenza virus. *Sem. Virol.*, 1998; 8: 491-495
- [52] Shan Y.X., Liu T.J., Su H.F., Samsamshariat A., Mestril R., Wang P.H.: Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003; 35: 1135-1143
- [53] Shimazaki K., Urabe M., Monahan J., Ozawa K., Kawai N.: Adeno-associated virus vector-mediated bcl-2 gene transfer into post-ischemic gerbil brain in vivo: prospects for gene therapy of ischemia-induced neuronal death. *Gene Ther.*, 2000; 7: 1244-1249
- [54] Shinya K., Makino A., Hatta M., Watanabe S., Kim J.H., Hatta Y., Gao P., Ozawa M., Le Q.M., Kawaoka Y.: Subclinical brain injury caused by H5N1 influenza virus infection. *J. Virol.*, 2011; 85: 5202-5207
- [55] Shoemaker A.R., Mitten M.J., Adickes J., Ackler S., Refici M., Ferguson D., Oleksijew A., O'Connor J.M., Wang B., Frost D.J., Bauch J., Marsh K., Tahir S.K., Yang X., Tse C. i wsp.: Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 3268-3277
- [56] Souers A.J., Levenson J.D., Boghaert E.R., Ackler S.L., Catron N.D., Chen J., Dayton B.D., Ding H., Enschede S.H., Fairbrother W.J., Huang D.C., Hymowitz S.G., Jin S., Khaw S.L., Kovar P.J. i wsp.: ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.*, 2013; 19: 202-208
- [57] Takizawa T., Fukuda R., Miyawaki T., Ohashi K., Nakanishi Y.: Activation of the apoptotic Fas antigen-encoding gene upon influenza virus infection involving spontaneously produced beta-interferon. *Virology*, 1995; 209: 288-296
- [58] Tripathi P., Koss B., Opferman J.T., Hildeman D.A.: Mcl-1 antagonizes Bax/Bak to promote effector CD4+ and CD8+ T-cell responses. *Cell Death Differ.*, 2013; 20: 998-1007
- [59] Tse C., Shoemaker A.R., Adickes J., Anderson M.G., Chen J., Jin S., Johnson E.F., Marsh K.C., Mitten M.J., Nimmer P., Roberts L., Tahir S.K., Xiao Y., Yang X., Zhang H. i wsp.: ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.*, 2008; 68: 3421-3428
- [60] Uribe-Carvajal S., Luévano-Martínez L.A., Guerrero-Castillo S., Cabrera-Orefice A., Corona-de-la-Peña N.A., Gutiérrez-Aguilar M.: Mitochondrial unselective channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion*, 2011; 11: 382-390
- [61] Wang S., Zhao Z., Bi Y., Sun L., Liu X., Liu W.: Tyrosine 132 phosphorylation of influenza A virus M1 protein is crucial for virus replication by controlling the nuclear import of M1. *J. Virol.*, 2013; 87: 6182-6191
- [62] Weiss R., Laengle J., Sachet M., Shurygina A.P., Kiselev O., Egorov A., Bergmann M.: Interleukin-24 inhibits influenza A virus replication in vitro through induction of toll-like receptor 3 dependent apoptosis. *Antiviral. Res.*, 2015; 123: 93-104
- [63] Wu X., Li S., Xue P., Li Y.: Liraglutide inhibits the apoptosis of MC3T3-E1 cells induced by serum deprivation through cAMP/PKA/ β -catenin and PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathways. *Mol. Cells*, 2018; 41: 234-243
- [64] Wurzer W.J., Planz O., Ehrhardt C., Giner M., Silberzahn T., Plechka S., Ludwig S.: Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J.*, 2003; 22: 2717-2728
- [65] Xie C., Edwards H., Caldwell J.T., Wang G., Taub J.W., Ge Y.: Obatoclax potentiates the cytotoxic effect of cytarabine on acute myeloid leukemia cells by enhancing DNA damage. *Mol. Oncol.*, 2015; 9: 409-421
- [66] Yang B., Prayson R.A.: Expression of Bax, Bcl-2, and P53 in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Mod. Pathol.*, 2000; 13: 1115-1120
- [67] Yang X.F., Zheng X.S., Liu W.G., Feng J.F.: Bcl-2 gene therapy for apoptosis following traumatic brain injury. *Chin. J. Traumatol.*, 2006; 9: 276-281
- [68] Yuan C.H., Filippova M., Duerksen-Hughes P.: Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, 2012; 4: 3831-3850
- [69] Zamarin D., García-Sastre A., Xiao X., Wang R., Palese P.: Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.*, 2005; 1: e4
- [70] Zheng W., Tao Y.J.: Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett.*, 2013; 587: 1206-1214
- [71] Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P.F.: Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.*, 2002; 76: 8682-8689

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.