



Kandidaatintutkielma

Mitokondriaalinen apoptoosi

Salla-Mari Tuutijärvi

Sisällysluettelo

1. Apoptoottiset signalointireitit	
1.1. Ulkoinen kuolemanreseptorireitti.....	6
1.2. Luontainen mitokondriaalinen reitti.....	7
1.2.1. BCL-2-proteiinivälitteinen säätely.....	9
1.2.2. p53:n toiminta.....	10
1.2.3. MOMP:n mekanismi ja dynamiikka.....	11
1.2.4. IMM:n rakenteen muokkaus.....	12
1.3. Kaspasi 8 ja BID-proteiini sekä GSDME yhdistävät apoptoottiset signalointireitit.....	13
2. Heterogeeninen MOMP sallii solun eloonjäämisen ja signaalitoiminnot.....	13
2.1. Epätäydellinen (incomplete) MOMP.....	14
2.2. Osittainen (minority) MOMP.....	15
3. MOMP ja tulehdus.....	16
3.1. cGAS-STING-signalointi.....	16
3.2. IAP:n hajottaminen.....	17
3.3. RNA-hajottajakompleksi ja dsRNA:n kasaantuminen.....	17
3.4. Apoptoosi vai tulehdusreaktio?.....	19
4. Mitokondriaalinen apoptoosi – potentiaalinen kohde sairauksien hoidossa.....	20
5. Lähteet.....	24

Käytetyt lyhenteet

A β	amyloid β
AIF	apoptosis inducing factor
ALPS	autoimmune lymphoproliferative syndrome
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
APAF-1	apoptotic peptidase activating factor 1
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
BAD	BCL-2-associated agonist of cell death
BAK	BCL-2 antagonist/killer
BAX	BCL-2-associated X-protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-W	B-cell lymphoma W
BCL-X _L	B-cell lymphoma extra-large
BFL1	BCL-2-related isolated from fetal liver
BH-domeeni	BCL-2 homology domain
BID	BH3-interacting domain death agonist
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BOK	BCL-2 family apoptosis leukemia 1 regulator
CAD	caspase-activated DNase
CAR-domeeni	caspase recruitment domain
CASP	caspase
Cdk	cyclic-dependent kinase
cGAMP	cyclic guanosine monophosphate-adenoside monophosphate
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CICD	caspase-independent cell death
CMV	cytomegalovirus
DAMP	danger-associated molecular pattern
DISC	death-inducing signaling complex
DRP1	dynamain-related protein 1
FADD	Fas-associated protein with death domain

FLIP	FLICE inhibitory protein
GAPDH	glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSDME	gasdermin E
HIV	human immunodeficiency virus
HMGB1	high mobility group box 1
Hrk	activator of apoptosis harakiri
IAP	inhibitors of apoptosis proteins
iCAD	inhibitor of caspase-activated DNase
IFN α/β	interferon α/β
IL-1 β	interleukin 1 β
IMM	inner mitochondrial membrane
iMOMP	incomplete MOMP
IRF3	interferon regulatory factor 3
IS-geenit	interferon-stimulated genes
JNK2	c-Jun N-terminal kinase
L-OPA1	the longest form of OPA1
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein
MCL1	myeloid cell leukemia 1
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MIMP	mitochondrial inner membrane permeabilization
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mtDNA	mitochondrial DNA
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NGF	nerve growth factor
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain containing 3
OMA1	overlapping activity with m-AAA protease
OMM	outer mitochondrial membrane
OPA1	optical nerve antrophy 1
PINK1	PTEN induced putative kinase 1
PNPase	polynucleotide phosphorylase
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyl transferase 1

PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
ROS	reactive oxygen species
SLE	systemic lupus erythematosus
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspase
STING	stimulator of interferon genes
SUMO	small ubiquitin-like modifier
tBID	truncated fragment of BID
TBK1	TANK binding kinase 1
TNF- α	tumor necrosis factor α
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNFRF1-associated via death domain
VDAC2	voltage-dependent anion channel 2
vMIA	viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis
XIAP	X-linked inhibitors of apoptosis proteins

1. Apoptoottiset signalointireitit

Apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema on tarkka, järjestelmällinen ja geneettisesti kontrolloitu tapahtumasarja, jonka tehtävänä on huolehtia yksilölle tarpeettomien, peruuttamattomasti vahingoittuneiden ja mahdollisesti haitallisten solujen tuhoamisesta. Apoptoosin läpikäyneelle solulle tyypillisiä piirteitä ovat kromatiinin tiivistyminen ja kasaantuminen tumakotelo vasten, DNA:n hajoaminen, tumen jakaantuminen pienemmiksi solukalvon ympäröimiksi rakenteiksi, solun tukirangan luhistuminen, solukalvon poimuuntuminen ja lopulta solun hajoaminen useiksi kalvorakenteiden ympäröimiksi rakkuloiksi. Fagocytoivat solut vastaavat näiden rakkuloiden sisäänotosta ja hajonneen solun makromolekyylien hajottamisesta ilman tulehdusreaktion syntyä. Monisoluisilla eläimillä apoptoosin perusmekanismi on evolutiivisesti erittäin konservoitunut ja sen virheetön toiminta on normaalin yksilönkehityksen, kudosten homeostasian ja normaalin fysiologian, immuunipuolustuksen ja syövän synnyn eston perusedellytys. Häiriöt apoptoosikoneiston toiminnassa, joko solujen puutteellisen tai liiallisen poiston kautta, on yhdistetty niin syövän syntyyn, hermokudosta rappeuttaviin tauteihin kuin autoimmuuni-, sydän- ja tulehdussairauksiin (Botham *et al.* 2015; Heino & Vuento 2015).

1.1. Ulkoinen kuolemanreseptorireitti

Tulehdussolujen vastinreseptorit ja sytokiinit toimivat solun ulkoisen kuolemanreseptorireitin aktivoijina sitoutuessaan solun pinnalla sijaitseviin kuolemanreseptoreihin (death receptors), joista parhaiten tunnettuja ovat Fas (CD95) ja TNFR (tumor necrosis factor receptor) (Heino & Vuento 2015; Galluzzi *et al.* 2018).

Viruksen infektoiman tulehdussolun pinnalla oleva Fas-ligandi (FasL eli CD95L) on kolmesta alayksiköstä koostuva trimeeri, joka sitoutuessaan solun Fas-reseptoriin aikaansaa kolmen Fas:n yhteenliittymän ja niiden solunsisäisten osien, kuolemandomeenien, aktivoitumisen. Tämä yhteenliittymä tarttuu FADD (Fas-associated protein with death domain)-adapteriproteiiniin muodostaen ns. kuolemanindusoivan signaalikompleksin (death-inducing signaling complex eli DISC). TNFR-1:n toiminta on hyvin samankaltainen Fas-reseptorin kanssa; liukoinen välittäjäaine, TNF- α (tumor necrosis factor α) toimii TNFR-1:n aktivoijana ja TRADD (TNFRF1-associated via death domain)-adapteriproteiini on osana muodostuvaa signaalikompleksia. DISC:n tehtävänä on säädellä aloitteentekijäkaspaasin, kaspaasi 8:n, aktivaatiota ja toimintaa. CASP8 (caspase 8) on intrasellulaarinen kysteiniiniproteaasi, joka sitoutuu DISC:n osana olevaan adapteriproteiiniin. Tämä interaktio saa aikaan

aloitteentekijäkaspaasin aktivaation autoproteolyttisten prodomeenien katkaisun ja dimerisaation seurauksena. Kaspaasi 8:n aktivaatio puolestaan laukaisee toimeenpanijakaspaasin, CASP3 ja 7 (caspase 3 & 7), aktiivisuuden ja sitä kautta ohjelmoidulle solukuolemalle ominaisen solujen proteiinien hajottamisen ja sellulaaristen toimintojen lakkaamisen (Heino & Vuento 2015; Galluzzi *et al.* 2018).

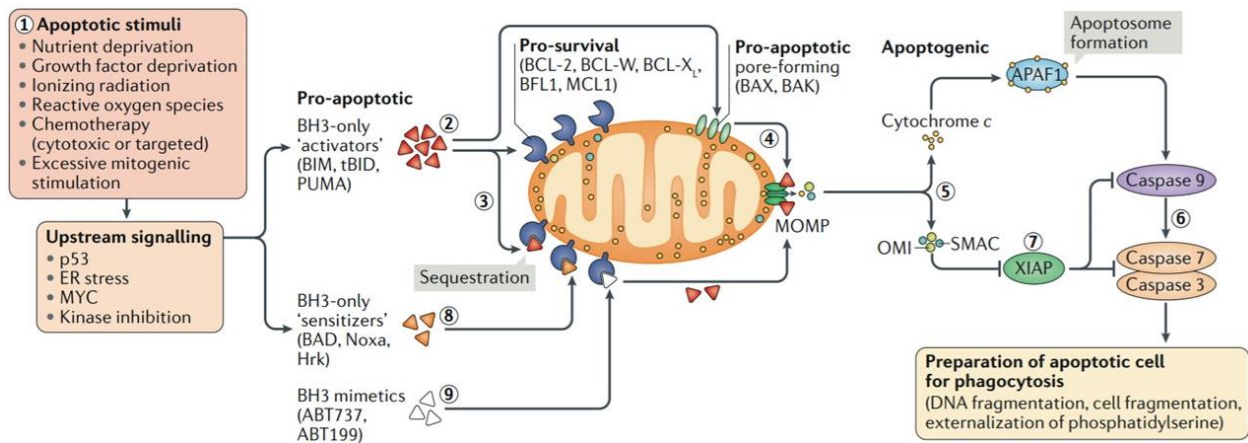
Ulkoisen kuolemanreseptoreitti on usean proteiinin säätelyn alaisena ja säätely on monitasoista. FLIP (FLICE inhibitory protein) inhiboi CASP8:n aktivaatiota estäen näin apoptoosiin johtavan tapahtumaketjun. IAP (inhibitors of apoptosis proteins)-proteiiniperhe vastaa toimeenpanijakaspaasi 3:n aktivaation inhiboinnista. Mitokondriaalinen proteiini SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase) toimii FLIP:n ja IAP-proteiiniperheen inhiboijana aikaansaaden apoptoosikoneiston aktivaation (Botham *et al.* 2015). CASP8:n entsyymaattista aktiivisuutta voidaan lisäksi säädellä vaihtoehtoisilla post-translationalaarisilla modifikaatioilla kuten fosforylaatiolla ja deubikitinaatiolla (Galluzzi *et al.* 2018).

1.2. Luontainen mitokondriaalinen reitti

Useat stressitekijät kuten kasvutekijöiden puute, DNA-vaurio, solulimakalvoston (ER) tai replikaatiokoneiston ylikuormitus, vapaiden happiradikaalien (ROS) ylimäärä tai ongelmat mitoosissa voivat toimia luontaisen mitokondriaalisen reitin stimuloijina aktivoiden BCL-2 (B-cell lymphoma 2) -proteiiniperheen jäsenet (Kuva 1). Tähän proteiiniperheeseen kuuluu sekä proapoptoottisia että antiapoptoottisia jäseniä, jotka toimivat avainasemassa mitokondriaalisen reitin säätelyssä ja siten yhdessä päättävät solun kohtalosta (Heino & Vuento 2015).

Proapoptoottisten BCL-2-proteiinien aktivaatio johtaa mitokondrion ulkokalvon permeabilisaatioon (MOMP) ja mitokondrion kalvopotentialin purkautumiseen, pisteeseen mitokondriaalisessa apoptoosissa, josta ei ole enää paluuta. MOMP:n vaikutuksesta sytoplasmaan vapautuu mitokondriosta apoptogeenisiä proteiineja, joista tärkeimpiä ovat sytokromi c, SMAC ja seriiniproteaasi OMI (Bock & Tait 2019). Sytokromi c sitoutuu sytoplasmassa APAF-1 (apoptotic peptidase activating factor 1)-monomeeriin aikaansaaden konformaatiomuutoksia, joiden seurauksena ADP korvautuu ATP:llä tai dATP:llä, jota seuraa APAF-1-oligomeerien syntyminen. Tämä rakennelma toimii pohjana suuremmalle supramolekulaariselle kompleksille, apoptosomille. Apoptosomi vastaa luontaisen mitokondriaalisen reitin aloitteentekijäkaspaasin, CASP9 (caspase 9), aktivaatiosta, jota edeltää CASP9:n homodimerisaatio ja CASP9/APAF1-heterodimeerien/multimeerien muodostuminen

CAR-domeenien (caspase recruitment domains) välityksellä (Dorstyn *et al.* 2018). CASP9:n aktivaatio puolestaan laukaisee toimeenpanijakaspasien, kaspaasi 3 ja 7, aktiivisuuden ja sitä kautta ohjelmoidulle solukuolemalle ominaisen solujen proteiinien hajottamisen ja solulaaristen toimintojen lakkaamisen (Heino & Vuento 2015).

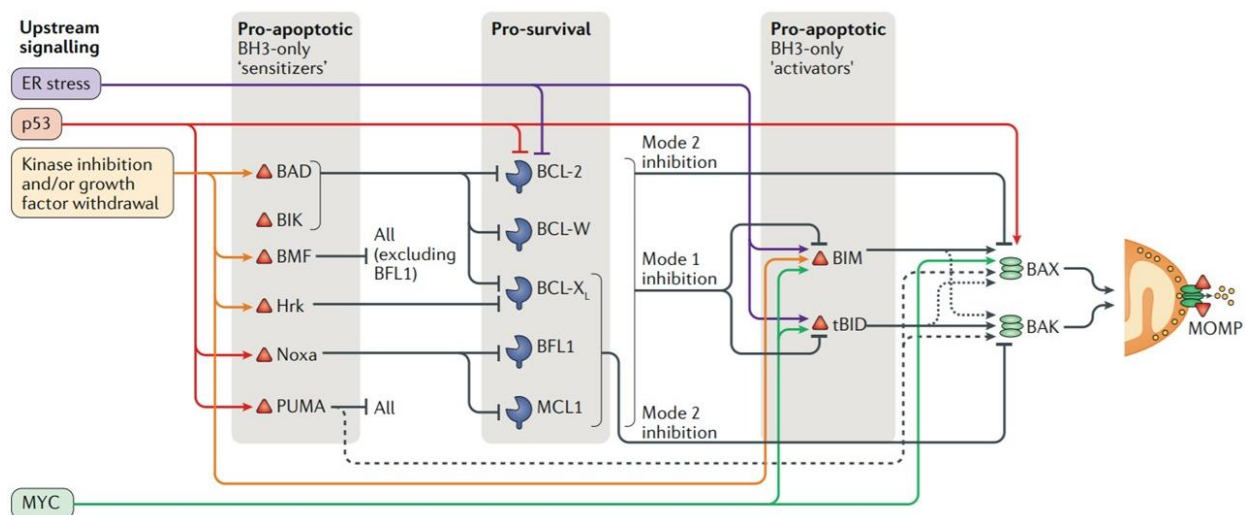


Kuva 1. Luontainen mitokondriaalinen reitti. Erilaiset stressitekijät yhdessä mitoottisten ongelmien kanssa (vaihe 1) aikaansaavat proapoptoottisten BCL-2-proteiinien aktivaation (vaihe 2). Proapoptoottiset BCL-2-proteiinit sitoutuvat ja inaktivoivat antiapoptoottisia BCL-2-proteiineja (vaihe 3) tai vastaavat proapoptoottisten efektoriproteiinien suorasta aktivoinnista (vaihe 4). Aktivoituneet BAX ja BAK oligomerisoituvat ja muodostavat huokosrakenteita, mikä johtaa mitokondrion ulkokalvon permeabilisaatioon. MOMP:n seurauksena mitokondrion kalvojen välisen tilan apoptogeeniset molekyylit vapautuvat sytoplasmaan. Sytokromi c:n sitoutuminen johtaa APAF-1:n aktivaation seurauksena apoptosomin muodostukseen (vaihe 5) ja aloitteentekijäkaspaasi CASP9:n aktivaation takia toimeenpanijakaspasien CASP3/7 toimintaan (vaihe 6). MOMP:n seurauksena mitokondriosta vapautuneet SMAC ja OMI (vaihe 5) voivat inhiboida kaspaasien inhiboinnista vastaavan XIAP:n (vaihe 7). Lisäksi apoptoottiset signaalit voivat johtaa BH3-only-”herkistäjä”-proteiinien aktivaatioon (vaihe 8). Näiden ”herkistäjien” toiminta perustuu niiden kykyyn inhiboida antiapoptoottisia BCL-2-proteiineja, minkä seurauksena BH3-only-”aktivaattori”-proteiinien toiminta on mahdollista (vaihe 8). BH3-jäljittelijöiden toiminta perustuu samaan periaatteeseen (vaihe 9). Kuvan lähde: (Singh *et al.* 2019)

1.2.1. BCL-2-proteiinivälitteinen säätely

BCL-2 (B-cell lymphoma 2) -proteiiniperhe koostuu antiapoptoottisista proteiineista, proapoptoottisista efektoreista ja proapoptoottisista BH3-only-proteiineista ja jokainen näistä jäsenistä sisältää yhdestä neljään BH (BCL-2 homology)-domeenia, BH1-BH4 (Kuva 2). Solun siirtyminen apoptoosiin vaatii sekä antiapoptoottisten proteiinien toiminnan estämisen, että proapoptoottisten efektoriproteiinien aktivaation (Singh *et al.* 2019).

BCL-2, BCL-X_L (B-cell lymphoma extra-large), BCL-W (B-cell lymphoma W), BFL1 (BCL-2-related isolated from fetal liver) ja MCL1 (myeloid cell leukemia 1) kuuluvat antiapoptoottisiin proteiineihin, jotka terveissä soluissa sitoutuvat proapoptoottisten efektorien ja BH3-only-proteiinien hydrofobiseen uurteeseen estäen näin niiden aktivaation. BAX (BCL-2-associated X-protein), BAK (BCL-2-antagonist/killer) ja BOK (BCL-2 family apoptosis leukaemia 1 regulator) ovat kolmesta BH- ja yhdestä TM-domeenista muodostuvia proapoptoottisia efektoriproteiineja. (Singh *et al.* 2019). BOK on BAX:n ja BAK:n sijaan riippumaton muista BCL-2-proteiineista, ja terveissä soluissa solulimakalvoston hajotuskoneisto (endoplasmic reticulum-associated degradation) pitää sen määrän alhaisena (Bock & Tait 2019). Proapoptoottiset BH3-only-proteiinit sisältävät nimensä mukaisesti ainoastaan yhden BH-domeenin, BH3, ja ne jaetaan toimintansa perusteella BH3-only-”aktivaattori”- ja BH3-only-”herkistäjä”-proteiineihin. Yhteistä näille BH3-only-proteiineille on niiden valikoiva kyky sitoutua ja muokata antiapoptoottisten BCL-2-proteiinien ja BAX:n ja/tai BAK:n aktiivisuutta. Solun kohdatessa apoptoottisen stimuluksen, BH3-only-proteiinien aktivaatio voi tapahtua usealla eri tasolla esim. transkription lisääntymisenä tai post-translationalisten modifikaatioiden kautta. BIM (BCL-2-interacting mediator of cell death), BID (BH3-interacting domain death agonist), PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis) ja Noxa kuuluvat BH3-only-”aktivaattori”-proteiineihin, sillä ne pystyvät suoraan (the direct model of activation) aktivoimaan BAX:n ja/tai BAK:n aikaansaaden niiden homodimerisaation, uusien BH3-only-proteiinien vapautumisen ja oligomerisaation, mikä lopulta johtaa mitokondrion ulkokalvon reikiintymiseen ja permeabilisaation. BH3-only-”herkistäjä”-proteiinit, BAD (BCL-2-associated agonist of cell death) ja Hrk (activator of apoptosis harakiri), toimivat antiapoptoottisten BCL-2-proteiinien aktivaation inhiboijina (the indirect activation model) ja näin ne edesauttavat muiden BH3-only-proteiinien aktivaatiota (Singh *et al.* 2019).



Kuva 2. BCL-2-proteiiniperheen jäsenet ja niiden välinen toiminta. BH3-only-”aktivaattori”-proteiinit voivat aktivoida proapoptoottiset BCL-2-efektoriproteiinit, BAX/BAK, johtaen mitokondrion ulkokalvon permeabilisaatioon. Antiapoptoottiset BCL-2-proteiinit voivat kuitenkin sitoutua BH3-only-”aktivaattori”-proteiineihin aiheuttaen niiden inhibition (malli 1). BH3-only-”herkistäjä”-proteiinit voivat sitoutua spesifisiin antiapoptoottisiin BCL-2-proteiineihin ”vapauttaen” näin niiden inhiboimat BH3-only-”aktivaattori”-proteiinit. Antiapoptoottisten proteiinien on myös mahdollista sitoutua BCL-2-efektoriproteiineihin, jolloin BAX/BAK:n oligomerisaatio estyy (malli 2). Apoptoottiset signaalit indusoivat ohjelmoitua solukuolemaa, jonka säätely perustuu BCL-2-proteiiniperheen jäsenten väliseen toimintaan. Tätä toimintaa ohjaa BCL-2-proteiinien ekspressiotasot. Kuvan lähde: (Singh et al. 2019)

1.2.2. p53:n toiminta

Yksi parhaiten tunnetuista tuumorisuppressiogeneistä eli kasvurajoitegeneistä on p53, jonka vaikutuksesta solun DNA-vaurio voi johtaa apoptoosin aktivoitumiseen. p53 toimii transkriptiotekijänä ja aktivoituttuaan sytoplasmassa se siirtyy tumaan, missä se säätelee useiden geenien ekspressiota. Vaikutus solusykliin välittyy p21-proteiinin kautta, jonka toiminnan seurauksena solusykli pysähtyy, kun sykliini/Cdk (cyclin-dependent kinase)-kompleksin toiminta estyy. Solusykli pysyy keskeytettynä, kunnes DNA-vaurio saadaan korjattua esim. p53:n aktivoiman ribonukleotidireduktaasin vaikutuksesta (Heino & Vuento 2015). DNA-vaurion ollessa liian suuri tai korjauksen epäonnistuessa, p53 edistää myös apoptoosia ilmentämällä BAX-, PUMA- ja Noxa-geenejä ja repressoimalla BCL-2-geeniä (Singh et al. 2019).

1.2.3. MOMP:n mekanismi ja dynamiikka

Proapoptoottiset efektorit BAX ja BAK vastaavat mitokondrion ulkokalvon permeabilisaation (MOMP) toimeenpanosta. Terveissä soluissa BAX on jatkuvassa liikkeessä mitokondrion ulkokalvon (OMM) ja sytosolin välillä joko lepotilassa olevana monomeerinä tai inaktiivisena dimeerinä. BAK esiintyy luonnostaan mitokondrion ulkokalvolla, johon se on kiinnittyneenä hydrofobisen C-terminaalien $\alpha 9$ -heliksin ja jännitteestä riippuvan anionikanava 2:n (VDAC2) vuorovaikutuksen välityksellä. Apoptoottisen stimuluksen seurauksena BAX/BAK-proteiinit aktivoituvat joko suoraan tai epäsuorasti BH3-only-proteiinien toiminnan kautta aikaansaaden niiden stabiloitumisen ja homodimerisaation mitokondrion ulkokalvolla (Letai *et al.* 2019). Lisäksi ns. membraani-indusoitua spontaania BAX/BAK aktivaatiomallia (membrane-induced spontaneous BAX/BAK activation model) on ehdotettu. Mallin mukaan BH3-only-proteiinien välittämä antiapoptoottisten BCL-2-proteiinien inaktivaatio yhdessä BAX/BAK-proteiinien C-terminaalissa sijaitsevan $\alpha 9$ -heliksin ja OMM:n välisen interaktion kanssa olisi riittävä aikaansaamaan BAX/BAK-proteiinien aktivaation – proapoptoottisista BH3-only-proteineista ja p53:sta riippumatta (O'Neill *et al.* 2016). BAX/BAK-dimeerit muodostavat edelleen oligomeerejä ja korkeamman asteen multimeerejä. Nämä multimeerit muodostavat mitokondrion ulkokalvolle huokosrakenteita (Letai *et al.* 2019). Proapoptoottisista BCL-2-efektoreista BAX on parhaiten tutkittu. BAX:n muodostamat huokosrakenteet ovat kooltaan ja muodoltaan epäyhtenäisiä sisältäen niin jonoja, renkaita, kaarimuodostelmia kuin satunnaisia pisteitä ja keräytyymiä, joista rengas- ja kaarirakenteiden on todettu osallistuvat mitokondrion ulkokalvon huokosrakenteiden muodostukseen ja ”clamp”-rakenteen kautta sen stabilointiin muiden BAX-molekyylien täydentäessä ja kasvattaessa huokosta (Salvador-Gallego *et al.* 2016).

Sytokromi c:n vapautuminen mitokondrion kalvojen välitilasta sytoplasmaan tapahtuu ’kaikki tai ei mitään’-periaatteella aikaansaaden kaspasien aktivaation, fosfatidyylikeriinin paljastumisen solukalvon sisäpuolelta ja apoptoosin käynnistymisen. Lisäksi sytokromi c:n vapautumisen on todettu aiheuttavan oksidatiivisen fosforylaation lakkaamisen ja edesauttavan vapaiden happiradikaalien muodostumista. On myös kokeellista näyttöä mitokondrion kyvystä ylläpitää omaa kalvopotentiaaliaan sytokromi c:n vapautumisen jälkeen, mikä viittaa ainakin osittaiseen elektroninsiirtoketjun ja F_0F_1 -ATPaasin toiminnan ylläpitoon. Sytokromi c:n vapautumisen on todettu olevan äkillinen, nopea ja täydellinen tapahtuma riippumatta apoptooppisen ärsykkeen voimakkuudesta/tyypistä/ajankohdasta. Myöskään lämpötilalla ei näytä olevan vaikutusta sytokromi c:n vapautumisen nopeuteen ja laajuuteen, mikä viittaa siihen, että kuljetukseen ei osallistu entsymaattisia kuljetusjärjestelmiä (Goldstein *et al.* 2000).

Apoptoottinen säätelyverkosto koostuu useasta positiivisesta feedback-loopista; 1) 'caspase loop' ja sen sytosoliset proteiinit kaspasi 9, 3 ja 7, ja XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), 2) 'BH3-protein loop', jonka BAX/BAK vastaavat MOMP:n täyttöönpaanosta ja 3) 'MOMP/caspase/BH3-protein loop', missä sytokromi c:n vapautuminen stimuloi CASP3:n ja 7:n aktivoitumisen ja tämä lisää ennestään sytokromi c:n vapautumista sytoplasmaan. Positiiviset feedback-loopit yhdessä solunsisäisen kommunikaation kanssa mahdollistavat apoptoosin etenemisen sytoplasmassa itseään ylläpitävinä laukaisija-aaltoina (self-regenerating trigger waves) ja näin ollen apoptoosi pystyy tapahtumaan myös isoissa soluissa, kuten hermo- ja munasolussa (Cheng & Ferrell 2018).

1.2.4. IMM:n rakenteen muokkaus

Mitokondrion sisäkalvo (IMM) vastaa oksidatiivisesta fosforylaatiosta, ja energian tuotannon tehostamiseksi se sisältää useita poimuja eli kristoja. IMM:n muokkauksen on esitetty edistävän sytokromi c:n vapautumista sytoplasmaan, sillä suurin osa sytokromi c:stä sijaitsee kristoissa osana elektroninsiirtoketjua. Mitokondriot ovat dynaamisia soluorganelleja ja MOMP:n seurauksena mitokondrioiden on havaittu käyvän läpi rakenteellisia muutoksia. DRP1 (dynamamin related protein 1) on mitokondriaalinen fissioproteiini, joka vastaa poimurakenteiden muokkauksesta ja mitokondrion laajamittaisesta pirstaloitumisesta. Tämän pirstaloitumisen seurauksena terveille soluille tyypillinen mitokondrion tubulaarinen fenotyyppi katoaa ja mitokondrio hajoaa useiksi pieniksi osasiksi, ns. punctiform-fenotyyppi (Frank *et al.* 2001).

DRP1:n on ehdotettu osallistuvan poimurakenteiden muokkaukseen mitokondrion sisäkalvon fuusioproteiini OPA1 (optical nerve atrophy 1):n välityksellä. OPA1 on dynamiinin kaltainen GTPaasi, joka vastaa poimurakenteiden stabiloinnista, säätelee kristojen liitoskohtien kokoa ja on osana kompleksia (the protein complex containing optical nerve atrophy 1), joka sitoo sytokromi c:tä. Terveissä soluissa OPA1 esiintyy oligomeereinä, jotka pitävät kristojen liitoskohdat kapeina. Stressitilassa useat proteaasit, tärkeimpänä sinkkimetalloproteaasi OMA1 (overlapping activity with m-AAA protease), aktivoituvat ja aikaansaavat L-OPA1 (the longest form of OPA1):n pilkkoutumisen ja OPA1-oligomeerien hajotuksen. Tämän seurauksena kristojen liitoskohdat laajenevat ja suurin osa kristoihin sidotusta sytokromi c:stä pääsee vapautumaan sytoplasmaan (Jiang *et al.* 2014). Lisäksi SUMO (small ubiquitin-like modifier) osallistuu mitokondrion huokosrakenteiden muokkaukseen säätelemällä DRP1:ä aikaansaaden

mitokondrion ja ER:n välisten kalvopintojen stabilisaation. Tämä stabilisaatio mahdollistaa huokosrakenteiden muokkaukseen vaadittavien Ca^{2+} -ionien sisään virtauksen mitokondrioon. Apoptoosin edetessä BAX/BAK:n muodostamat huokosrakenteet laajenevat ns. makrohuokosiksi aikaansaaden IMM:n työntymisen OMM:n läpi, IMM:n repeämisen ja mitokondriaalisen DNA (mtDNA):n vapautumisen (Bock & Tait 2019).

1.3. Kaspasi 8 ja BID-proteiini sekä GSDME yhdistävät apoptoottiset signalointireitit

Apoptoottiset signalointireitit ovat yhteydessä toisiinsa ns. vahvistus-looppien (amplification loop) välityksellä. CASP8 pystyy aktivoimaan CASP3:n joko suoraan ulkoisella kuolemanreseptorireitillä tai epäsuoraan luontaisella mitokondriaalisella reitillä proapoptoottisen BH3-only-proteiinin, BID:n, kautta. CASP8 aikaansaa BID:n pilkkoutumisen ja sen aktiivisen muodon tBID (truncated fragment of BID):n muodostumisen. tBID kulkeutuu tämän jälkeen mitokondrioon, aktivoi proapoptooppiset efektoriproteiinit BAX/BAK:n ja signaalikaskadin edetessä edelleen CASP3:n ((tBID)-mitochondria-apoptosome amplification loop). tBID:n lisäksi gasdermin E (GSDME):n on todettu toimivan toisena yhdistävä komponenttina apoptoottisten signalointireittien välillä. GSDME on gasdermin-superproteiiniperheeseen kuuluva proteiini, joka BAX/BAK:n tapaan kykenee muodostamaan huokosrakenteita mitokondrion ulkokalvolle aikaansaaden näin sen permeabilisaation. Ulkoisen kuolemanreseptorireitin aktivoituessa, CASP3 aikaansaa GSDME:n aktiivisen muodon, GSDME-N, muodostumisen. GSDME-N kulkeutuu tBID:n tapaan mitokondrion ulkokalvolle, missä se edesauttaa mitokondriaalisen apoptoosin täyttöönpäntä (Bock & Tait 2019; Rogers *et al.* 2019).

2. Heterogeeninen MOMP sallii solun eloonjäämisen ja signaalitoiminnot

Mitokondrion ulkokalvon permeabilisaation katsotaan tapahtuvan 'kaikki tai ei mitään'-periaatteella toimien pisteenä mitokondriaalisissa apoptoosissa, josta ei ole enää paluuta. MOMP:n laajuudesta ja voimakkuudesta riippuen sen on kuitenkin todettu sisältävän muutama poikkeus, jolloin solut eivät ajaudukaan apoptoosiin, vaan tietyin signaalitoiminnoin solut onnistuvat selviytymään MOMP:sta. Tällöin solut joutuvat läpikäymään 'kaspaseista riippumattoman solukuoleman', CICD (caspase-independent cell death), seurauksena joko

mitokondrioiden toiminnan heikkenemisestä tai mitokondrioista vapautuvista välittäjämolekyyleistä, AIF (apoptosis inducing factor), endonukleaasi G ja seriiniproteaasi OMI. Pelkkä kaspasien inhibitio ei ole kuitenkaan riittävä solujen selviytymiseen MOMP:sta ja kaspasi-inhibition lisäksi CICD:lle tyypillisiä piirteitä ovat solun energiametabolian ylläpito ja tehostettu autofagia. GAPDH (glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) toimii avainensyyminä CICD:n säätelyssä. GAPDH:n glykolyyttinen rooli solun energia-aineenvaihdunnassa mahdollistaa mitokondrion kalvopotentialin ylläpidon ja GAPDH:n toimiminen transkriptionaalisenä koaktivaattorina stimuloi autofagiaa aikaansaaden permeabilisaation poiston toimimattomien mitokondrioiden tuhoamisen kautta (Colell *et al.* 2007).

2.1. Epätäydellinen (incomplete) MOMP

Epätäydellinen (incomplete) MOMP on esimerkki heterogeenisestä MOMP:sta, jossa apoptoottinen stimulus johtaa solun enemmistö mitokondrioiden ulkokalvon permeabilisaatioon. Nimensä mukaisesti MOMP on kuitenkin epätäydellistä ja pienempi osa solun mitokondrioista pysyy koskemattomina säilyttäen rakenteensa ja toimintansa. Koskemattomuus on seurausta mitokondrioiden ulkokalvon antiapoptoottisten BCL-2-proteiinien pitoisuuden noususta ja BAX/BAK-aktivaation inhibitiosta, mikä mahdollistaa mitokondrioiden reagoimattomuuden MOMP:lle ja estää solun ajautumisen apoptoosiin. Epätäydellinen MOMP (iMOMP) on kaspaseista riippumaton ja sen on todettu tapahtuvan kaikissa solutyypeissä. Esimerkiksi sympaattisissa neuroneissa NGF (nerve growth factor):n puute aikaansaa mitokondrioiden ulkokalvon permeabilisaation, mutta kaspasi-inhibition ja kasvutekijän lisäyksen seurauksena osa mitokondrioista säilyttää koskemattomuutensa mahdollistaen hermosolun eloonjäämisen. Energiametabolian ylläpito ja tehostettu autofagia GAPDH:n toiminnan seurauksena edesauttavat koskemattomien mitokondrioiden nopeaa lisääntymistä ja solun mitokondriaalisen verkoston uudelleen järjestäytymistä (Tait *et al.* 2010).

2.2. Osittainen (minority) MOMP

Vähäiset stressitekijät ja esim. alhainen pitoisuus sytotoksista BH3-jäljittelijää (BH3-mimetics) tai mitoottista inhibiittoria on todettu laukaisevan solussa osittaisen (minority) MOMP:n, jossa vain pieni osajoukko mitokondrioista läpikäy ulkokalvon permeabilisaation. Osittainen MOMP ei johda solun apoptoosiin, vaikka erona epätäydelliseen MOMP:iin, se ylläpitää kaspasien aktivaatiota. Kaspasien aktivaatiota ja toimintaa säädellään kuitenkin tiukasti useilla eri mekanismeilla sisältäen esimerkiksi sytokromi c:n hajottamisen, heikennetyn aktivaatio- ja toimintatehokkuuden sekä kaspasi-inhibiittoreiden ekspression. Osittaisen MOMP:n laajuuden mukaan sillä voi olla sekä positiivisia että negatiivisia vaikutuksia solun toimintaan. Kaspasien toiminnan on todettu aiheuttavan soluissa, sekä *in vitro* että *in vivo*, DNA-vaurioiden syntymistä ja perimän epästabiilisuuden lisääntymistä edesauttaen näin sellulaarista transformaatiota ja tuumorigeneesiä. Osittaisen MOMP:n vaikutus DNA-vaurioiden syntymiseen välittyy CAD (caspase-activated DNase):n välityksellä ja CASP3:n välittämän endonukleaasi G:n vapautumisella mitokondriosta. CASP3 osallistuu lisäksi CAD:n aktivaatioon vastaamalla sen inhibiittorin iCAD:n (inhibitor of caspase-activated DNase) inaktivaatiosta. JNK2 (c-Jun N-terminal kinase):n on todettu toimivan avainasemassa osittaisen MOMP:n DNA-vauriovasteessa. Onkogeenisuuden lisäksi osittaisen MOMP:n on todettu osallistuvan syöpäsolun vastaiseen toimintaan mm. neoantigeenien välityksellä. Lisäksi osittaisella MOMP:lla on tärkeä merkitys elimistön fysiologiassa mm. osallistumalla kaspasiasignaalin kautta solujen erilaistumiseen ja lisääntymiseen sekä intrasellulaariseen patogeenvasteeseen tulehdussignaalin välityksellä (Ichim *et al.* 2015; Bock & Tait 2019).

3. MOMP ja tulehdus

Apoptoosi on tarkasti säädelty kaspaseista riippuvainen hiljaisen solukuoleman muoto, jonka merkittävänä erona muihin solukuoleman muotoihin on sen kyky olla aiheuttamatta tulehdusreaktiota. Useat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että apoptoosin käynnistävä MOMP on synnynnäisesti tulehdusta edeltävä. CASP9-puutteisilla hiirillä tehdyt *in vivo* ja *in vitro* -tutkimukset osoittavat, että puutteet luonnollisella mitokondriaalisella reitillä aikaansaavat hiirillä voimakkaan resistanssin RNA- ja DNA-viruksia vastaan sekä muutoksia veren kantasolujen toiminnassa. Mitokondrion ja kaspasien tehtävänä ei siis ole ainoastaan vastata solun kohtalosta, joko säilyä hengissä tai ajautua apoptoosiin, vaan myös määrätä kuoleeko solu tulehduksellisesti vai ilman tulehdusreaktiota – ns. kaksoiskontrolli. Mitokondrio vastaa näin ollen sekä tulehdusvasteen aktivoinnista että tämän vasteen inaktivoinnista kaspasien toiminnan kautta (Rongvaux *et al.* 2014).

3.1. cGAS-STING-signalointi

Proapoptoottiset efektorit BAX ja BAK aikaansaavat mitokondrion ulkokalvon permeabilisaation, joka johtaa huokosrakenteiden laajenemisen seurauksena mitokondrion sisäkalvon permeabilisaatioon (MIMP) ja mitokondriaalisen DNA (mtDNA):n vapautumiseen (Kuva 3). MIMP:n on todettu tapahtuvan MOMP:a hitaammin, satunnaisemmin ja mitokondrion dynamiikasta riippumatta (Riley *et al.* 2018). mtDNA:n sitoutuminen sytoplasmassa cGAS (cyclic GMP-AMP synthase)-proteiiniin aikaansaa toisiolähetti cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate):n muodostumisen ATP:stä ja GTP:stä. Tämä dinukleotidi sitoutuu ja aktivoi adaptoriproteiini STING (stimulator of interferon genes):n, joka vastaa TBK1 (TANK binding kinase 1):n aktivoitumisesta. Kinaasientsyyminä TBK1 fosforyloi transkriptiotekijän IRF3 (interferon regulatory factor 3):n aikaansaaden interferonien, IFN α ja IFN β , sekä NF- κ B (nuclear factor- κ B):n ekspression. Tyypin I interferonit IFN α ja IFN β ovat sytokiineja, jotka vastaavat elimistössä synnynnäisen antiviraalisen immuunivasteen muodostamisesta. Sitoutuessaan omiin reseptoreihinsa ne aikaansaavat IS (interferon-stimulated)-geenien ekspression (Rongvaux *et al.* 2014).

mtDNA:n vapautuminen mitokondriosta ja sen aikaansaama tulehdusreaktio on yhdistetty useisiin sairauksiin, kuten Parkinsonin tautiin. Parkinsonin tauti on seurausta mitofagiaa säätelevien entsyymien, E3 ubiqitiiniligaasi Parkinin tai mitokondriaalisen kinaasi PINK1 (PTEN induced putative kinase 1):n, puutteellisesta toiminnasta, joka johtaa toimimattomien

mitokondrioiden kerääntymiseen soluihin. Parkinin ja PINK1:n puute aikaansaa cGAS-STING-signaaloinnin aktivaation kautta tulehdusvasteen syntymisen. Adaptoriproteiini STING:n poisto signalointireitiltä estää tulehdusvasteen syntymisen lisäksi dopaminergisten neuronien tuhoutumisen ja Parkinsonin taudille tyypillisten oireiden kehittymisen (Bock & Tait 2019).

3.2. IAP:n hajottaminen

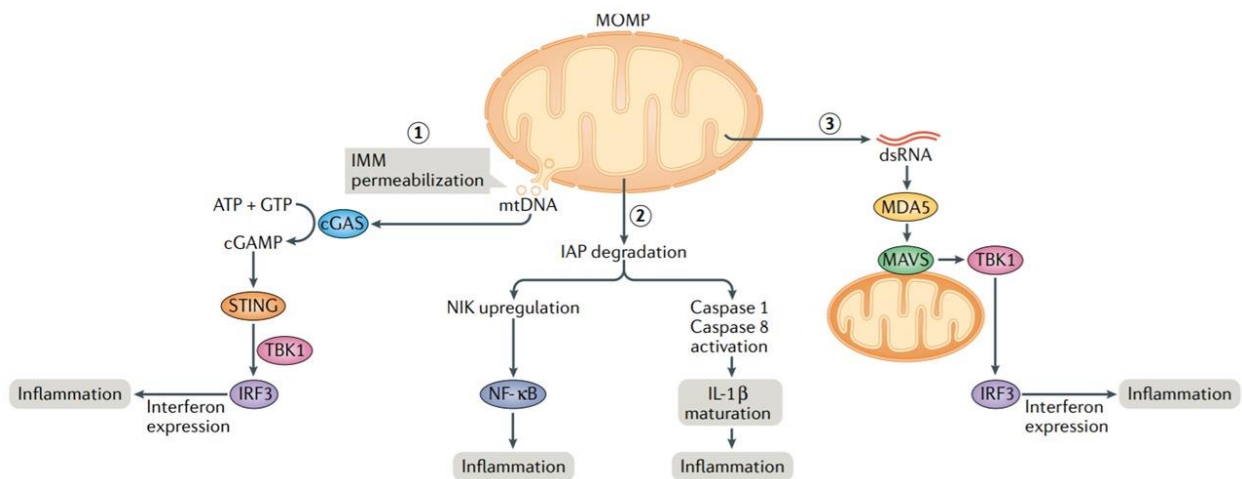
mtDNA-välitteisen tulehdussignaaloinnin lisäksi MOMP voi johtaa tulehdukseen IAP:n proteosomaalisen hajotuksen kautta (Kuva 3). Olosuhteissa, joissa kaspasiaktiivisuus on inhiboitu, MOMP aikaansaa cIAP1/cIAP2 (cellular inhibitors of apoptosis proteins):n määrän laskun johtaen NIK (NF- κ B-inducing kinase):n tehostuneen toiminnan välityksellä NF- κ B (nuclear factor- κ B):n aktivaatioon. MOMP välittää NIK:n stabilisaation ja aktivaation SMAC-jäljittelijöiden (SMAC mimetics) kaltaisella mekanismilla. MOMP:n ajama NF- κ B-aktivaation on todettu aikaansaavan makrofageissa potentiaalisen antituumorigeenisen vaikutuksen ja tuumorien kasvun taantumisen. Näin ollen tuumorispesifisen CICD:n käynnistäminen syöpähoidoissa voi olla tehokkaampi hoitokeino syöpäsolun apoptoosin laukaiseminen sijasta (Giambazolias *et al.* 2017).

Makrofageissa IAP:n hajotus käynnistää NF- κ B:n aktivaation lisäksi CASP8:n välittämän IL-1 β :n aktivaation. BAX/BAK:n käynnistämä MOMP aikaansaa toimeenpanijakaspasien CASP3 ja CASP7 toiminnan kautta cIAP:n ja XIAP:n inhibition johtaen CASP8:n aktivaatioon. Toimeenpanijakaspasien aktivaatio johtaa lisäksi K⁺-ionien ulosvirtaukseen, jolloin intrasellulaarinen K⁺-ionikonsentraatio laskee. K⁺-ionien ulosvirtaus aikaansaa NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain containing 3)-inflammasomin aktivaation ja ASC (apoptosis-associated speak-like protein containing CARD)-adaptoriproteiinivälitteisen CASP1:n aktivaation. CASP1 aktivoituu samanaikaisesti IAP:n hajotuksen ja CASP8:n aktivaation kanssa aikaansaaden tehostetun IL-1 β :n tuotannon (Vince *et al.* 2018).

3.3. RNA-hajottajakompleksi ja dsRNA:n kasaantuminen

Lisäksi mtDNA:sta bidirektionaalisen transkription seurauksena syntyvällä kaksijuosteisella mtRNA:lla (mtdsRNA) on todettu olevan rooli interferonivasteen syntymisestä (Kuva 3). Terveissä soluissa RNA-hajottajakompleksi vastaa mitokondriaalisen dsRNA:n hajotuksesta, mutta BAX/BAK:n indusoiman MOMP:n läpikäyneissä soluissa RNA-hajottajakompleksin

komponenttien, mitokondriaalinen RNA-helikaasi SUV3 ja polynukleotidi fosforylaasi PNPase, inhibitio johtaa näiden kaksijuosteisten RNA-molekyylien kertymiseen sytoplasmaan. Varsinkin fosforylaasi PNPase:lla on tärkeä rooli mtdsRNA:n muodostuksen ja vapautumisen estämisessä. Sytoplasmassa adaptoriproteiini MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) toimii ensisijaisena mtdsRNA-sensorina aikaansaaden MAVS (mitochondrial antiviral signalling protein):n aktivaation välityksellä NF- κ B:n ja IRF3:n aktivaation ja interferonivasteen syntymisen (Dhir *et al.* 2018).



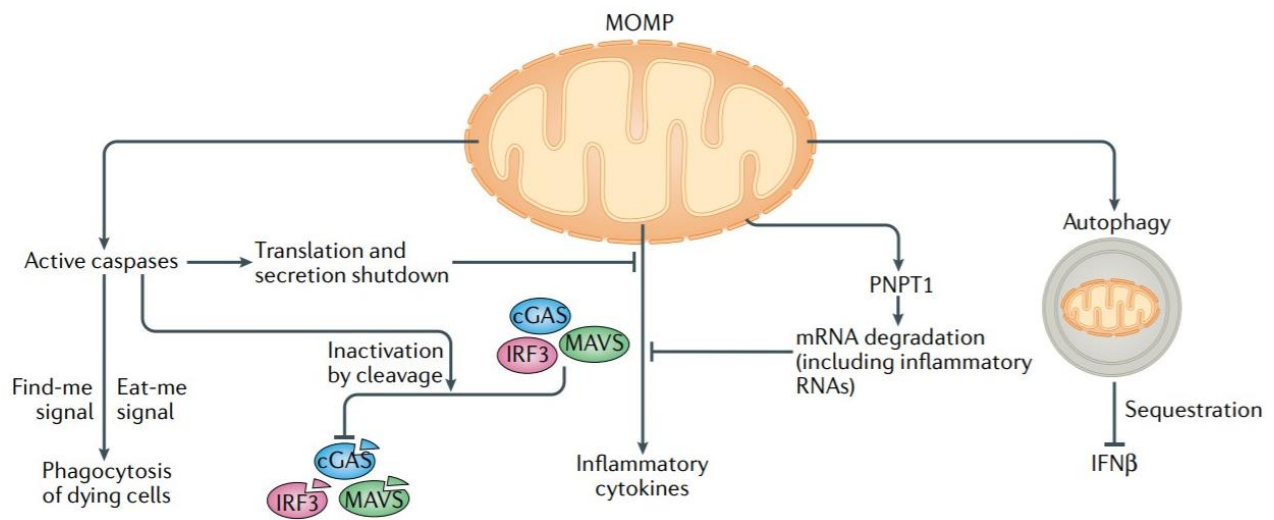
Kuva 3. Mitokondrion ulkokalvon permeabilisaation (MOMP) aktivoimat tulehdussignaalintireitit. Aktivoituneet BAX ja BAK oligomerisoituvat ja muodostavat huokosrakenteita aikaansaaden mitokondrion ulkokalvon permeabilisaation. Huokosrakenteiden laajeneminen johtaa mitokondrion sisäkalvon permeabilisaatioon (MIMP) ja mitokondriaalisen DNA:n vapautumiseen sytoplasmaan (vaihe 1), mtDNA osallistuu sytoplasmassa cGAS-STING-signaloinnin aktivoimiseen ja lopulta interferonivasteen kehittymiseen. Kaspasi-inhiboituissa olosuhteissa MOMP voi johtaa IAP:n proteosomaaliseen hajotukseen ja sen seurauksena tapahtuvaan NIK:n aktivaatioon ja NF- κ B-signalointiin (vaihe 2). IAP:n hajotus voi lisäksi johtaa IL-1 β :n tuotantoon. RNA-hajottajakompleksin toimimattomuuden seurauksena kaksijuosteinen mitokondriaalinen RNA (dsmtRNA) pääsee kertymään sytoplasmaan ja sitoutumaan siellä adaptoriproteiini MDA5:een (vaihe 3). MAVS:n aktivaatio johtaa lopulta interferonivasteen syntymiseen. Kuvan lähde: (Bock & Tait 2019)

3.4. Apoptoosi vai tulehdusreaktio?

Useimmissa tilanteissa MOMP johtaa tulehdusreaktion sijaan ohjelmoituun solukuolemaan, mikä on seurausta apoptoottisten kaspasien aktivaatiosta (Kuva 4). Apoptoottiset kaspasit vastaavat immuunijärjestelmän homeostasian ylläpidosta inhiboimalla tulehdusta useilla eri mekanismeilla. Ihmisellä CASP3:n on todettu toimivan tärkeänä negatiivisena säätelijänä pilkkomalla ja inaktivoimalla tulehdussignaloinnin pääkomponentteja, cGAS:a, IRF3:ta ja MAVS (mitochondrial antiviral signalling protein):a. CASP7 osallistuu myös vähemmissä määrin synnynnäisen immunitetin säätelyyn ihmisillä, kun taas hiirillä se vastaa kokonaan cGAS-STING-signaloinnin negatiivisesta säätelystä. Apoptoottisilla kaspaseilla on siis tärkeä rooli sytokiinin ylituotannon kontrolloimisessa, autoimmuunisairauksien syntymisessä ja apoptoosin eteenpäin viemisessä ilman tulehdusreaktion syntymistä (Ning *et al.* 2019). Myös proteiinien translaation ja eritystoiminnan estäminen on olennainen osa apoptoottisten kaspasien tulehdusta hillitseviä mekanismeja (Bock & Tait 2019).

Apoptoottiset kaspasit osallistuvat tulehdusreaktion sammuttamiseen ja vaimentamiseen negatiivisen DAMP (danger-associated molecular pattern)-signaloinnin välityksellä. DAMP, kuten interleukiini-33/1 α , genominen DNA, yksijuosteinen RNA, virtsahappo, ATP ja HMGB1 (high mobility group box 1) ovat sellulaarisen stressin tai kudonvaurion seurauksena vapautuvia endogeenisiä viestiaineita, joiden vapautuminen aikaansaa immuunijärjestelmän aktivaation. Apoptoottiset kaspasit inaktivoivat joko suoraan tai epäsuorasti näitä endogeenisiä viestiaineita tai saavat aikaan niiden ”takavarikoinnin”, jolloin syntyvä immuunivaste heikentyy tai estyy kokonaan. Apoptoottiset solut vapauttavat myös ns. ’find-me’-, ’eat-me’- ja ’tolerate-me’-signaaleja. Nämä signaalit esim. ATP/UTP, sfingosiini-1-fosfaatti ja lysofosfotidylikoliini johtavat syöjäsolujen aktivaatioon aikaansaaden tehostetun fagosytoosin, jonka tarkoituksena on löytää, tunnistaa ja poistaa apoptoottiset solut ennen niiden tulehdusta indusoivien molekyylien vapautumista (Martin *et al.* 2012).

MOMP:n aikaansaama PNPT1 (polyribonucleotide nucleotidyl transferase 1):n vapautuminen mitokondrion kalvojen välisestä tilasta sekä autofagian aktivoituminen ovat esimerkkejä täydentävistä tulehdusta hillitsevistä mekanismeista, jotka ovat kaspaseista riippumattomia. PNPT1 vastaa tulehdusvasteen synnyttämiseen osallistuvien proteiinien mRNA:n hajottamisesta, ja autofagian aktivaatio johtaa toimimattomien mitokondrioiden ja niiden tulehdusta indusoivien molekyylien poistoon (Bock & Tait 2019).



Kuva 4. Apoptoottiset kaspasit inhiboivat proteiinien translaatiota ja eritystoimintaa, mikä estää tulehduksellisten sytokiinien tuotantoa. Aktiiviset kaspasit osallistuvat tulehdussignaaloinnin pääkomponenttien cGAS:n, MAVS:n ja IRF3:n suoraan pilkkomiseen ja inaktivoimiseen. Lisäksi ne tehostavat apoptoottisten solujen poistoa fagosytoivien solujen aktivoinnin välityksellä, mikä vähentää tulehdusta indusoivien molekyylien vapautumista. Syöjäsolut aktivoituvat apoptoottisten solujen vapauttamien 'find-me'- ja 'eat-me'-signaalien toimesta. PNPT1:en vapautuminen mitokondrion kalvojen välisestä tilasta sekä autofagian aktivoituminen kuuluvat tulehdusta hillitseviin täydennysmekanismeihin. Kuvan lähde: (Bock & Tait 2019)

4. Mitokondriaalinen apoptoosi – potentiaalinen kohde sairauksien hoidossa

Apoptoosikoneiston toiminnan häiriöt solujen puutteellisen poiston kautta ilmenevät parhaiten syöpäsoluja tutkittaessa. Ensisijaisena syöpäsolun tunnusmerkkinä pidetään apoptoosin välttelemistä, joka tapahtuu useiden mekanismien kautta vaihdellen niin eri syöpätyyppien välillä kuin syöpätyypin sisällä. Solutyypin mukaan niiden alttius ohjelmoidulle solukuolemalle vaihtelee, ns. ”apoptotic priming”, ja esim. verenkiertoelimistön solut ovat huomattavasti herkempiä apoptoosille kuin hermokudos ja munuaiset. Syöpäsolut heikentävät proapoptoottista signalointia alentamalla proapoptoottisten proteiinien (BIM, BID, BAX, Puma ja Hrk) ekspressiota ja inaktivoimalla niiden toimintaa mutaatioiden, fosforylaation sekä muiden post-translacionaalisten ja -transkriptionaalisten mekanismien välityksellä. Vastaavasti syöpäsolut tehostavat antiapoptoottista signalointia lisäämällä antiapoptoottisten proteiinien (BCL-2, MCL1, BCL-X_L, BFL1 ja BCL-W) ja IAP:en ekspressiota ja aktivaatiota. Nämä mekanismit mahdollistavat syöpäsolujen eloonjäämisen, mutta säilyttävät niiden herkyyden apoptoosille syöpähoidoissa, kuten sytotoksisissa kemoterapiassa tai säteilyhoidossa. Syöpäsolut pystyvät kuitenkin tehostamaan vastustuskykyään ja välttelemään apoptoosia

lisämekanismeilla esim. ”herkistäjä”-proteiinien mutaatioilla ja alentamalla proapoptoottisten efektoriproteiinien BAX/BAK:n toimintaa (Messmer *et al.* 2019; Singh *et al.* 2019).

Syöpähoidot perustuvat terapeuttien tekijöiden kykyyn aktivoida apoptoosi osallistumalla BCL-2-proteiinien säätelyyn. BH3-jäljittelijät (BH3-mimetics), esim. ABT-737, ovat antiapoptoottisten BCL-2-proteiinien antagonisteja, joiden toiminta perustaa niiden kykyyn edesauttaa proapoptoottisten BCL-2-proteiinien toimintaa ja käynnistää mitokondriaalinen apoptoosi (Kuva 5). BH3-jäljittelijöiden tarkka kohdennus tiettyihin solutyyppeihin esim. syöpäsoluihin on osoittautunut vielä ongelmaksi, jolloin apoptoosin indusointi terveissäkin soluissa on mahdollista. BH3-jäljittelijöitä voidaan hyödyntää syövän hoidon lisäksi patogeeni-infektioissa, autoimmuunisairauksissa ja elinsiirroissa, joten ne ovat laajan tutkimuksen kohteena. SMAC-jäljittelijöitä (SMAC mimetics) käytetään BH3-jäljittelijöiden rinnalla syövän hoidossa ja niiden toiminta kohdistuu cIAP-proteiiniperheen jäseniin ja kaspasi-inhibiittoreihin. SMAC-jäljittelijät estävät apoptoosia inhiboivien proteiinien toimintaa edesauttaen kaspasien aktivaatiota. Lisäksi ne tehostavat cIAP-proteiiniperheen jäsenten ubiquitinaatiota ja hajotusta, mikä ennestään lisää solujen herkkyyttä apoptoosiin. Syöpähoitoja mietittäessä on myös otettava huomioon syöpähoidon kyky aktivoida immuunivaste. Gammasäteilyn ja hyperisiini-PDT-hoidon ohella perinteinen kemoterapia, kuten antrasykliinin, proteaasi-inhibiittori bortetsomibin ja oksaliplatiini-platinajohdannaisen käyttö johtaa hiljaisen solukuoleman sijaan tulehdukselliseen solukuoleman muotoon, mikä ennestään laajentaa mitokondriaalisen apoptoosin merkitystä potentiaalisena hoitokohteena (Messmer *et al.* 2019).

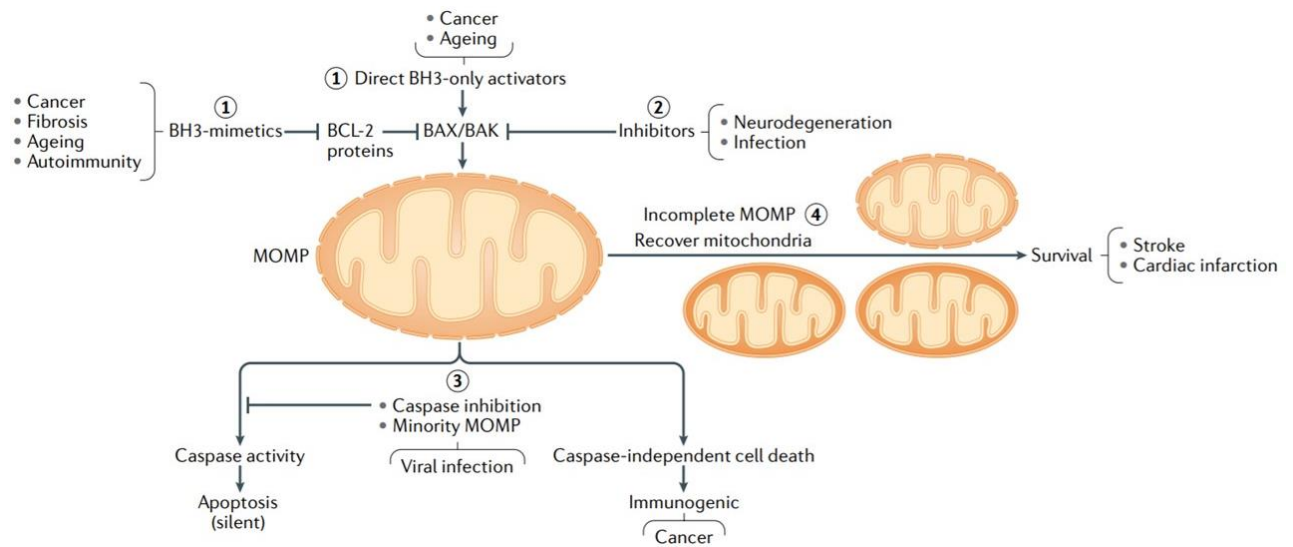
Autoimmuunisairaudet ilmentävät syövän ohella vakuuttavimmat todisteet apoptoosin toimimattomuudesta. Proapoptoottisten BCL-2-proteiinien kuten BIM:n puute yhdessä antiapoptoottisen BCL-2:n ylituotannon kanssa on yhdistetty solujen vasta-ainetuotantoon elimistön omia antigeenejä vastaan. Systeeminen lupus erythematosus (SLE), autoimmuunilymfoproliferatiivinen oireyhtymä (ALPS) ja Crohnin tauti ovat esimerkkejä autoimmuunisairauksista, joiden yhdistävä tekijänä toimii solujen apoptoosin puutteellinen toiminta. Esimerkiksi Crohnin taudille tyypilliset oireet ovat seurausta T-solujen huomattavasta ylimäärästä (Singh *et al.* 2019).

Apoptoosikoneiston toiminnan häiriöt sekä solujen puutteellisen poiston että liian tehokkaan tuhoamisen kautta on todettu liittyvän myös intrasellulaaristen patogeenien aiheuttamiin sairauksiin. Patogeeniset mikro-organismit pyrkivät isäntäsolun infektoidessaan turvaamaan oman replikaationsa ja leviämisen, ja siksi niiden tulee pysyä ”piilossa” isäntäsolun

immuunipuolustuksen soluilta. Tämä tunnistamattomana pysyminen ja isäntäsolun itsetuhon estäminen tapahtuu mikro-organismien syntetisoimien tekijöiden välityksellä, joiden toiminta perustuu isäntäsolun apoptoosin heikentämiseen. Esim. tuberkuloosibakteerin (*M. tuberculosis*) soluseinän komponentti PPAR γ (perixosome proliferator-activated receptor γ) tehostaa antiapoptoottisen BCL-2-proteiinin MCL1:n tuotantoa ja sytomegalovirus (CMV) heikentää isäntäsolun apoptoosia vMIA (viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis):n tuotannon välityksellä. vMIA on rakenteeltaan antiapoptoottisen BCL-X_L:n kaltainen. Intraselulaaristen patogeenien aiheuttamat sairaudet voivat ilmetä myös liiallisen apoptoosin seurauksena. Esim. HIV (human immunodeficiency virus) tehostaa ohjelmoitua solukuolemaa useiden eri mekanismien kautta. Ensinnäkin HIV stimuloi T-solujen apoptoosia tuottamalla HIV-proteaseja, jotka pilkkovat ja inaktivoivat antiapoptoottisia BCL-2-proteiineja. Lisäksi infektoidut isäntäsolut erittävät virukselle tyypillisiä proteiineja, kuten gp120, TAT ja NEF, jotka stimuloivat ennestään aktiivia apoptoottisia signaalintireittejä. Yleiskaspaasi-inhibiittoreita, esim. Z-VAD-FMK, käytetään toimeenpanijakaspaasien toiminnan hillitsemiseen, ja niiden käytöllä on todettu olevan positiivisia vaikutuksia patogeenitulehduksissa ja traumaattisissa aivovaurioissa. Niiden teho ei kuitenkaan kohdistu suoraan mitokondrion ulkokalvon permeabilisaatioon, eikä niillä siten ole vaikutusta mitokondrion toimivuuden ylläpitoon (Singh *et al.* 2019).

Alzheimerin tauti, amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALP), Parkinsonin tauti ja Huntingtonin tauti kuuluvat hermokudosta rappeuttaviin sairauksiin, joita yhdistää väärinlaskostuneiden proteiinien kertyminen ja saostuminen neuroneihin ja ekstrasellulaariseen soluväliaineeseen. Vaikka apoptoosi on elintärkeä prosessi yksilön normaalille aivojen kehitykselle ennen syntymää ja syntymän jälkeen, aikuisen yksilön hermosolut eivät pääosin vastaanota apoptoottisia signaaleja. Kuitenkin hermokudosta rappeuttavissa sairauksissa apoptoosikoneisto toimii tehostetusti johtaen neuronien toimimattomuuteen ja tuhoutumiseen. Esim. Alzheimerin taudille tyypilliset A β (amyloid β)-peptidikertymät indusoivat neuronien apoptoosia antiapoptoottisen BCL-2:n inaktivaation, BCL-2-efektoriproteiini BAX:n tehostetun toiminnan, vapaiden happiradikaalien aiheuttaman stressin ja apoptoottisten signaalikaskadien tehostamisen vaikutuksesta (Singh *et al.* 2019). Parkinsonin taudille tyypillinen motorisen toimintakyvyn lasku on seurausta dopaminergisten neuronien tuhoutumisesta, mikä on yhdistetty mitokondrioiden toimimattomuuteen PINK1:n ja p53-välitteisen BCL-2-efektoriproteiini BAX:n toiminnan kautta. *In vitro* -hiirikokeet ovat antaneet näyttöä siitä, että pienimolekyylinen yhdiste A (compound A) estää dopaminergisten neuronien tuhoutumisen. Yhdiste A sitoutuu mitokondriaalisen elektronisiirtoketjun

sukkinaattidehydrogenaasin B-alayksikköön ylläpitäen mitokondrion toimintaa ja solun energiainmetaboliaa estäen näin proapoptoottista BCL-2-proteiini BIM:a käynnistämästä ohjelmoitua solukuolemaa (Jiang *et al.* 2016).



Kuva 5. Mitokondriaalisen apoptoosin potentiaaliset hoitokohteet. BH3-jäljittelijöitä käytetään antiapoptoottisten BCL-2-proteiinien inhibointiin, mikä johtaa apoptoosin aktivoitumiseen (vaihe 1). Apoptoosi voidaan käynnistää lisäksi suoraan efektoriproteiinien BAX/BAK:n aktivoinnilla, mitä voidaan hyödyntää syövän, fibroosin ja autoimmuunisairauksien hoidossa. Hermokudosta rappeuttavien sairauksien ja patogeeni-infektioiden hoidossa BAX/BAK:n suoralla inhiboinnilla voidaan estää apoptoosin käynnistyminen (vaihe 2). Apoptoosin ohjaus tulehdukselliseen solukuoleman muotoon kaspasi-inhiboinnin välityksellä aikaansaa immuunivasteen tehostumisen, mitä voidaan hyödyntää syöpä- ja antiviraalisissa hoidoissa (vaihe 3). Heterogeeninen MOMP laajentaa entisestään mitokondriaalisen apoptoosin merkitystä hoitokohteena esim. aivohalvauksen ja sydäninfarktin hoidossa (vaihe 4). Kuvan lähde: (Bock & Tait 2019)

6. Lähteet

Bock FJ & Tait SWG (2019) Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 85-100.

Cheng X & Ferrell JE Jr (2018) Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves. *Science* 361, 607–612.

Colell A, Ricci J-E, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, et al. (2007) GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129, 983–997.

Dhir A, Dhir S, Borowski LS, Jimenez L, Teitell M, Rötig A, et al. (2018) Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans. *Nature* 560, 238–242.

Dorstyn L, Akey, CW & Kumar S (2018) New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ.* 25, 1194–1208.

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Gatez F, et al. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515–525.

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.

Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, Bock F, Cloix C, Cao K, et al. (2017) Mitochondrial permeabilization engages NF- κ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat. Cell Biol.* 19, 1116–1129.

Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI & Green DR (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* 2, 156–162.

Heino J & Vuento M (2015) Biokemian ja solubiologian perusteet. 4. uudistettu painos. Sanoma Pro Oy, Helsinki.

Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, Muthalagu N, Giampazolias E, Delgado ME, et al. (2015) Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* 57, 860–872.

- Jiang X, Jiang H, Shen Z & Wang X (2014) Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 14782–14787.
- Jiang X, Li L, Ying Z, Pan C, Huang S, Li L, et al. (2016) A small molecule that protects the integrity of the electron transfer chain blocks the mitochondrial apoptotic pathway. *Mol. Cell* 63, 229–239.
- Martin SJ, Henry CM & Cullen SP (2012) A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol. Cell* 46, 387–397.
- Messmer MN, Snyder AG & Oberst A (2019) Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy. *Cell Death Differ.* 26, 115–129.
- Ning X, Wang Y, Jing M, Sha M, Lv M, Gao P, et al. (2019) Apoptotic caspases suppress type I interferon production via the cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol. Cell* 74, 19–31 e17.
- O’Neill KL, Huang K, Zhang J, Chen Y & Luo X (2016) Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev.* 30, 973–988.
- Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O’Prey J, Pearson M, et al. (2018) Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J.* 37, e99238
- Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ & Weil PA (2015). *Harper’s Illustrated Biochemistry*, 30th ed. The McGraw-Hill Education, United States.
- Rogers C, Erkes DA, Nardone A, Aplin AE, Fernandes-Alnemri T & Alnemri ES (2019) Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nat. Commun.* 10, 1689.
- Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. (2014) Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 159, 1563–1577.
- Salvador-Gallego R, Mund M, Cosentino K, Schneider J, Unsay J, Schraermeyer U, et al. (2016) Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J.* 35, 389–401.
- Singh R, Letai A & Sarosiek K (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 175–193.

Tait SWG, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayer L, Connell S, Munoz-Pinedo C, et al. (2010) Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* 18, 802–813.

Vince JE, De Nardo D, Gao W, Vince AJ, Hall C, McArthur K, et al. (2018) The mitochondrial apoptotic effectors BAX/BAK activate caspase-3 and -7 to trigger NLRP3 inflammasome and caspase-8 driven IL-1 β activation. *Cell Rep.* 25, 2339–2353 e2334.