

ANNA HORDYJEWSKA, KAZIMIERZ PASTERNAK

Apoptotyczna śmierć komórki

Apoptotic Death of the Cell

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego AM w Lublinie

Streszczenie

Apoptoza jest dla organizmu ważnym procesem, gdyż prowadzi do usunięcia z organizmu komórek zbytecznych, szkodliwych lub uszkodzonych. Apoptoza może też zostać zahamowana, np. w przypadku procesów nowotworowych lub może być nasiloną, a gdy dotyczy komórek krwi, szczególnie leukocytów, może się wiązać z osłabioną odpornością organizmu. Do czynników, które kierują komórkę na drogę samobójstwa, należą między innymi: reaktywne formy tlenu, promieniowanie jonizujące, nadfioletowe, cyjanki, azydki i inne. Morfologiczne objawy apoptozy to obkurczanie się komórki, co powoduje utratę kontaktu z komórkami sąsiednimi, gęstnienie cytozolu oraz charakterystyczne formowanie przez błonę komórkową i błonę jądrową uwypukleń odrywających się od komórki i zwanych ciałkami apoptotycznymi. Biochemia procesu apoptozy wiąże się z pobudzeniem pewnych receptorów (rodzina receptorów TNF), z aktywowaniem jednych białek (np. kaspazy, białek adaptorowych, białek z rodziny bcl-2), a niszczeniem innych białek komórki (np. miozyny, aktyny, α -fodryny) oraz z ostateczną degradacją DNA przez nukleazy (*Adv Clin Exp Med 2005, 14, 3, 545–554*).

Słowa kluczowe: apoptoza, kaspazy, rodzina białek bcl-2, rodzina receptorów TNF.

Abstract

Apoptosis is a very important process for human organism similarly as proliferations of cells, because it leads to move out of the body of redundant, harmful or damaged cells. Sometimes apoptosis may be stopped – especially in case of cancer, or may be increased for example in blood cells particularly in leukocytes, what may be connected with lower immune response. To factors which cause apoptosis belong: oxygen reactive species, ionizing radiation, ultraviolet radiation, cyanides, azides and others. The morphological symptoms of apoptosis are: cell shrinkage what causes loss of a contact with other cells, cytoplasmic condensation and typically membrane blebbing and forming of apoptotic bodies. Biochemistry of apoptosis is connected with activation of specified receptors (TNF family receptors), with activation of some protein (such as for eg. caspases, adaptor proteins, bcl-2 proteins family), and elimination of others protein (myosine, actine, α -fodrine) and with final DNA degradation by nucleases (*Adv Clin Exp Med 2005, 14, 3, 545–554*).

Key words: apoptosis, caspases, bcl-2 protein family, TNF receptor family.

Różnice między apoptozą a martwicą

Po raz pierwszy określenie apoptoza (z greckiego *apoptosis* – „opadanie liści”) użyli Kerr, Wyllie oraz Currie w 1972 r. Oznacza serię swoich przemian morfologicznych i biochemicznych determinowanych ekspresją odpowiednich genów [1, 2], innymi słowy jest to zaprogramowana genetycznie śmierć komórki (PCD – *programmed cell death*). Apoptoza jest procesem, przez który organizm kontroluje ilościowo i jakościowo

komórki, i w razie konieczności pozbywa się ich. Morfologiczne objawy apoptozy to: obkurczanie się komórek, co powoduje utratę kontaktu z komórkami sąsiednimi, kondensacja chromatyny w zbitą masę w pobliżu błony jądrowej, rozpad jądra na mniejsze fragmenty, rozpad DNA na odcinki o długości 180–200 par zasad, gęstnienie cytozolu spowodowane utratą wody. W końcowej fazie apoptozy błona komórkowa i błona jądrowa tworzą uwypuklenia odrywające się od komórki zwane ciałkami apoptotycznymi, w skład których wchodzi niezmiennione morfologiczne fragmenty

jądra lub pozostałe organella komórkowe. Komórki nie wykazują widocznych objawów degeneracji, a wytworzone ciała apoptotyczne są szybko fagocytowane przez makrofagi lub inne komórki sąsiadujące, co sprawia, że apoptoza nie wywołuje stanów zapalnych w organizmie [3–11]. Apoptoza jest jednak procesem wymagającym syntezy ATP, syntezy białek i utrzymania ciągłości błony komórkowej. W trakcie apoptozy następuje aktywacja nukleaz i proteaz – dochodzi do degradacji proteolitycznej i nukleolitycznej. Po raz pierwszy podobny rodzaj śmierci z takimi objawami opisał Walther Fleming w 1885 r. i określił go jako chromatoliza [12]. Wyróżnia się trzy rodzaje programowanej śmierci komórki (PCD):

1) podstawowy model zaprogramowanej śmierci komórki, oparty na wyżej opisanej morfologii (właściwa apoptoza),

2) autofagowo-lizosomalna śmierć komórki według Schwechela i Merkera, która charakteryzuje się wczesnym pojawieniem się lizosomów i autofagowych wakuoli, które rozkładają głównie cytoplazmę. Odbywa się jeszcze przed kondensacją chromatyny, np. ten rodzaj PCD indukuje tamoksyfen w ludzkiej linii MCF-7,

3) trzeci rodzaj PCD jest obserwowany w pewnych tkankach owadów z charakterystyczną ekspresją poliubikwityny i proteinaz [13].

W 1995 r. Levin zasugerował, że można wyróżnić apoptozę fizjologiczną, toksyczną i kompensacyjną. Według tej klasyfikacji fizjologiczna apoptoza pojawia się w czasie rozwoju organizmu oraz w organizmach dorosłych w celu utrzymania prawidłowej homeostazy. Apoptoza spowodowana lub pośredniczona przez środki chemiczne, bakterie czy niedotlenienie narządów i tkanek jest określana mianem toksycznej apoptozy, gdyż powoduje uszkodzenie zdrowej komórki. Kompensacyjna apoptoza to ta, w wyniku której dochodzi do obumierania komórek, przez co wyrównuje się nieprawidłowy wzrost ich podziałów (np. w nowotworze wątroby).

Martwica jest to proces zachodzący pod wpływem bodźców mechanicznych, fizycznych czy chemicznych o dużym stężeniu. Apoptoza dotyczy pojedynczej komórki, podczas gdy martwicy podlega większa liczba komórek – niekiedy cała tkanka [1, 2, 14]. Martwica jest procesem pasywnym, niewymagającym ekspresji genów. W początkowej fazie komórka jest napęczniała, chromatyna tworzy agregaty, a dopiero w końcowej fazie następuje rozerwanie błony komórkowej i całkowita dezintegracja struktur komórkowych, dochodzi do zakłócenia pracy pomp jonowych w błonie komórkowej, co prowadzi do dezintegracji cytoszkieletu i wewnątrzkomórkowego przeładowania Ca^{2+} [1]. Komórka charakteryzuje się zatem: pęcznieniem,

napływem wody oraz jonów Ca^{2+} , rozpadem błony cytoplazmatycznej, co prowadzi do stanu zapalnego i jest procesem patologicznym, następuje uszkodzenie organelli (mitochondria i lizosomy ulegają lizie), a w surowicy wzrasta stężenie enzymów AlAT, AspAT, LDH (tab. 1) [15].

Kaspazy

Uruchomienie programu apoptozy wiąże się z aktywacją bądź unieczynnieniem niektórych białek komórki. Zestaw genów i białek uczestniczących w apoptozie zależy od typu komórki i bodźców prowadzących do jej samobójstwa. Jednak bez udziału pewnej grupy białek apoptoza najprawdopodobniej nie występowałaby. Tymi białkami są kaspazy – wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne (cysteinowe), które przecinają cząsteczki białek po określonej sekwencji aminokwasów. Poszczególne kaspazy różnią się od siebie sposobem aktywacji oraz swoistością substratową. Kaspazom przypisuje się kluczowe znaczenie dla przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy. Wszystkie poznane dotychczas kaspazy są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy o masie 32–53 kDa zawierające w końcu N prodomenę o różnej długości (3–24 kDa), składające się z dwóch podjednostek: większej (17–21 kDa) oraz mniejszej (10–13 kDa) [17], połączonych krótkim łącznikiem. Prodomena ta uczestniczy w dimeryzacji cząsteczek prokaspaz oraz utrzymaniu ich w formie nieaktywnej, po czym zostaje odszczepiona. Aktywną enzymatycznie formą kaspaz jest tetramer $(p20)_2(p10)_2$ powstały w wyniku autoproteolizy lub działania innych kaspaz czy proteaz, np. granzymu B [6]. Mimo że ogólna budowa kaspaz jest podobna, to jednak ze względu na swoistość substratową wyróżnia się trzy podstawowe podrodziny, które łączy to, że dokonują cięcia po reszcie kwasu asparaginowego (D):

1) kaspazy pierwszej grupy wykazują swoistość substratową do sekwencji aminokwasów WHED (np. kaspazy 1, 4 i 5),

2) druga grupa kaspaz preferuje sekwencję DEXD z absolutną obecnością kwasu asparaginowego w miejscu pierwszym (np. kaspaza 2, 3 oraz 7),

3) grupa trzecia rozpoznaje sekwencję (I/L/V)EXD (np. kaspaza 6, 8 oraz 9).

Grupa pierwsza kaspaz uczestniczy w procesie zapalnym, podczas gdy druga i trzecia są istotne w niszczeniu innych komórek oraz w przekazywaniu sygnałów apoptozy. Kaspazy można również podzielić na kaspazy inicjatorowe (induktorzy), które zapoczątkowują proces apoptozy oraz efektorowe (efektory). Pierwsze z nich mają długą prodomenę zawierającą różne motywy, np. efek-

Tabela 1. Podstawowe cechy apoptozy i martwicy [wg 2, 5, 14, 16]**Table 1.** The major features of apoptosis and necrosis [see 2, 5, 14, 16]

	Apoptoza (Apoptosis)	Martwica (Necrosis)
Rodzaj śmierci (Type of death)	zaprogramowana	spontaniczna
Kształt komórki (Shape of the cell)	obkurczenie	obrzemiecie, pęcznienie i liza
Kształt organelli (Shape of organellas)	bez zmian	pęcznienie
Błona komórkowa (Cell membrane)	tworzenie ciałek apoptotycznych	dezintegracja
Rodzaj odpowiedzi immunologicznej (Type of immune response)	fagocytoza bez stanu zapalnego i nacieku komórek	wyraźny stan zapalny z napływem makrofagów
Zmiany w jądrze (Changes in nucleus)	chromatyna skondensowana w pobliżu błony jądrowej	karioliza, pylenoliza lub karioneksja
Fragmentacja DNA (DNA fragmentation)	zorganizowana, DNA pocięte na fragmenty o długości 180–200 pz.	gwałtowna, przypadkowa
Rozbicie DNA przez (DNA break by)	endonukleazy	enzymy lizosomalne
Synteza białek (Protein's synthesis)	wymagana	zahamowana
Biochemia procesu (Biochemistry)	proces enzymatyczny – aktywacja kaspaz, nukleaz	zakłócona równowaga jonowa (napływ jonów Ca^{2+})
Zapotrzebowanie na energię (Energy supply)	wymagane	niewymagane
Elektroforeza w żelu agarozowym (Electrophoresis in agarose gel)	tworzenie drabinki DNA	tworzenie smugi DNA

tywną domenę śmierci, tzw. DED (*death effector domain*) czy też domenę werbunku kaspaz, tzw. CARD (*caspase recruitment domain*), które wiążą je z ich swoistymi aktywatorami. Do kaspaz inicjatorowych należą: kaspaza 1, 2, 4, 5, 8–13, a wśród kaspaz efektorowych wyróżnia się: kaspazę 3, 6, 7 oraz 14. Kaspazy z dłuższą prodomeną są zdolne do autoproteolizy, a także aktywują kaspazy efektorowe, np. kaspaza 8 aktywuje zarówno siebie samą, jak i kaspazę 3 oraz 7, które nie mają tej właściwości (tab. 2) [3, 7, 8].

Substratami kaspaz mogą być białka cytozolowe, a także jądrowe; między innymi kaspazy trawią białka, takie jak:

– białka cytoszkieletu: aktynę, β -kateninę, α -fodrynę, gelsolinę, keratynę,

– białka jądrowe: laminy jądrowe, polimerazę poli-ADP-rybozy (PARP), histon H1, białko Rel-B, rybonukloproteinazę U1-70 kDa, białko Mdm2 – negatywny regulator białka supresorowego p53, kinazę zależną od DNA (DNA-PK – *DNA-dependent protein kinase*), topoizomerazy I i II, białko Rb – kontroluje przechodzenie komórki przez kolejne fazy cyklu komórkowego, białko odpowiedzialne za kondensację chromatyny (ACINUS – *apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus*),

– białka regulatorowe: inne prokaspazy, kinazę FAK (*focal adhesion kinase*), kinazę 1 (MEKK1), fosfolipazę A2, białko DFF-45 (DNA

– *fragmentation factor*), białko ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*) [6, 8, 17].

Endonukleazy

Cechą charakterystyczną komórek apoptotycznych odróżniającą je od komórek nekrotycznych jest rozpad DNA na fragmenty o długości 180–200 par zasad. Za proces ten są odpowiedzialne endonukleazy, które katalizują rozerwanie wiązań internukleosomalnych. Są one zależne od jonów Ca^{2+} lub Mg^{2+} , przeważnie o optimum działania w pH 7,5, a ich inhibitorami mogą być jony Zn^{2+} , EDTA czy EGTA. Poznano kilka nukleaz uczestniczących w procesie apoptozy. Endonukleazę NUC-18 opisał Gaido i Cidlowski (1991 r.), a odkryto ją w limfocytach. W komórkach nie ulegających apoptozie występuje w formie nieaktywnej w postaci kompleksu o masie > 100 kDa. Oczyszczona nukleaza NUC-18 ma podobną sekwencję aminokwasów co cyklofilina A. DNaza I zależna od jonów Ca^{2+} , dokonuje cięcia pozostawiając wolny koniec 5'–P oraz 3'–OH, obecna jest w szorstkim retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego, pęcherzykach wydzielniczych oraz przestrzeni okołojądrowej. DNaza II jest zależna od jonów Ca^{2+} oraz Mg^{2+} . Opisano też i inne endonukleazy, jak np.: endonukleazę AW 34; DNazę γ [2, 9, 10, 12, 16, 18], czy czynnik DFF

Tabela 2. Rodzaje kaspaz [wg 8]**Table 2.** Type of caspases [see 8]

Kaspaza (Caspase)	Nazewnictwo (Name)	Długość domeny (Long of domain)	Ciężar cząsteczkowy (kDa) (Molecular weight) (kDa)
Kaspaza 1	ICE	długa	45
Kaspaza 2	ICH-1, Nedd-2	długa	51
Kaspaza 3	Cpp-32, Yama, apopain	krótka	32
Kaspaza 4	TX, ICH-2, ICErel-II	długa	43
Kaspaza 5	TY, ICErel-III	krótka	48
Kaspaza 6	Mch2	krótka	34
Kaspaza 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	krótka	35
Kaspaza 8	FLICE, Mach, Mch5	długa	55
Kaspaza 9	ICE-LAP6, Mch6	długa	46
Kaspaza 10	Mch4	długa	55
Kaspaza 11	mICH-3, mCASP-11	długa	43
Kaspaza 12	MICH-4, mCASP-12	długa	50
Kaspaza 13	ERICE	długa	43
Kaspaza 14	MICE	krótka	30

(DNA – *fragmentation factor*), którego zadaniem jest fragmentacja DNA. Jest heterodimerem składającym się z 2 podjednostek 40 i 45 kDa. Podjednostka DFF45 ma 2 miejsca rozpoznawane przez kaspazę 3 i pełni rolę regulatorową, a podjednostka DFF40 jest podjednostką katalityczną nukleazy (CAD/DFF40 – *caspase activated DNase*) [2, 8].

Rodzina receptorów TNF

Kaspazy można aktywować za pośrednictwem niektórych receptorów błonowych, np. z rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów. Do rodziny tej należą receptory TNF-R (typ I i II), receptor czynnika wzrostu nerwu (p75, NGF-R), receptor CD27, antygen CD40 oraz antygen Fas/Apo1. Receptory te należą do białek błonowych, które wykazują wyraźną homologię w części zewnątrzkomórkowej oraz pewne podobieństwo w części cytoplazmatycznej. Część zewnątrzkomórkowa (koniec – C) zawiera 3–6 domen bogatych w cysteinę, które uczestniczą w rozpoznawaniu ligandów. W cytoplazmatycznej części są obecne charakterystyczne sekwencje aminokwasów (80–90 aa), które tworzą tzw. domenę śmierci DD (*death domain*). Mutacje w tej części powodują, że receptory te nie są zdolne do indukowania apoptozy. Domena ta jest obecna również w kinazie DAP, białkach adaptorowych (FADD, TRADD, RIP) i niektórych białkach strukturalnych, jak np. ankyryna [6]. Receptory TNF-R1 oraz TNF-R2 są zdolne do przekazywania sygnałów prowadzących zarówno do śmierci, jak i proliferacji komórki. Ich synteza jest związana z cAMP, IL-2, stymulacją mitogenami, LPS. Receptor TNF-R1 wiąże się z białkami adaptorowy-

mi, takimi jak: TRADD, FAN, TRAF2, RIP, z kolei receptor TNF-R2 z TRAF1 oraz TRAF2 [19]. Receptor Fas (CD95 lub Apo1) jest obecny na powierzchni komórek układu immunologicznego, szczególnie limfocytach T oraz B, a także w nowotworowych komórkach limfoidalnych, komórkach grasicy, wątroby, nerek, serca. Należy do receptorów glikozylowanych o masie 45 kDa, który po związaniu ligandu lub przeciwciała ulega oligomeryzacji [6, 8, 20]. Receptor CD27 jest obecny tylko na powierzchni określonych subpopulacji limfocytów T lub B i bierze udział zarówno w indukowaniu ich do apoptozy, jak i proliferacji, przy czym koniec N jest nieco krótszy niż cytoplazmatyczny fragment TNF-R1/R2 czy Fas oraz różni się tym, że nie ma domeny DD [6, 9]. Antygen CD40 jest glikoproteiną o masie 40 kDa obecną na limfocytach B, makrofagach, komórkach endotelialnych, fibroblastach, keratynocytach, komórkach dendrytycznych oraz niektórych komórkach nowotworowych, np. raka pęcherza moczowego, piersi, jajników, skóry. Stanowi tzw. drugi sygnał aktywacji, gdyż łącząc się z ligandem CD40L (antygen CD154) aktywuje limfocyty B oraz makrofagi. Jego pobudzenie wiąże się z regulacją układu odpornościowego, włączając w to prawidłową proliferację oraz różnicowanie limfocytów B, ochronę przed zakażeniami, odrzucanie przeszczepów. Sugeruje się, że w komórkach nowotworowych połączenie CD40 z ligandem może mieć różny skutek. Alexandroff et al. [21, 22] zaobserwowali, że połączenie CD40 z rekombinowanym ligandem powodowało wzrost stężenia ICAM-1 oraz Fas na powierzchni komórek nowotworowych oraz wzrost wytwarzania pewnych cytokin, np. IL-6, IL-8, co indukowało apoptozę i prowadziło do zahamowania wzrostu. Inni badacze sugerują, że aktywacja CD40 nie powoduje apopto-

zy, wręcz przeciwnie – stymuluje ich podziały. Hollmann et al. [22] w wyniku stymulacji receptora CD40 linii komórkowych A20 oraz M12 (z ekspresją IgG, będących odpowiednikami dojrzałych limfocytów B) odnotowali zahamowanie wzrostu oraz wzrost odsetka komórek apoptotycznych w przeciwieństwie do linii WEHI 231 oraz WEHI 279 (linie nowotworowe powstałe w wyniku napromieniowania lub traktowania olejami mineralnymi, z ekspresją IgM, reprezentujące niedojrzałe limfocyty B). Zatem rola CD40 w komórkach nowotworowych nie jest do końca poznana i prawdopodobnie zależy od typu nowotworu [19].

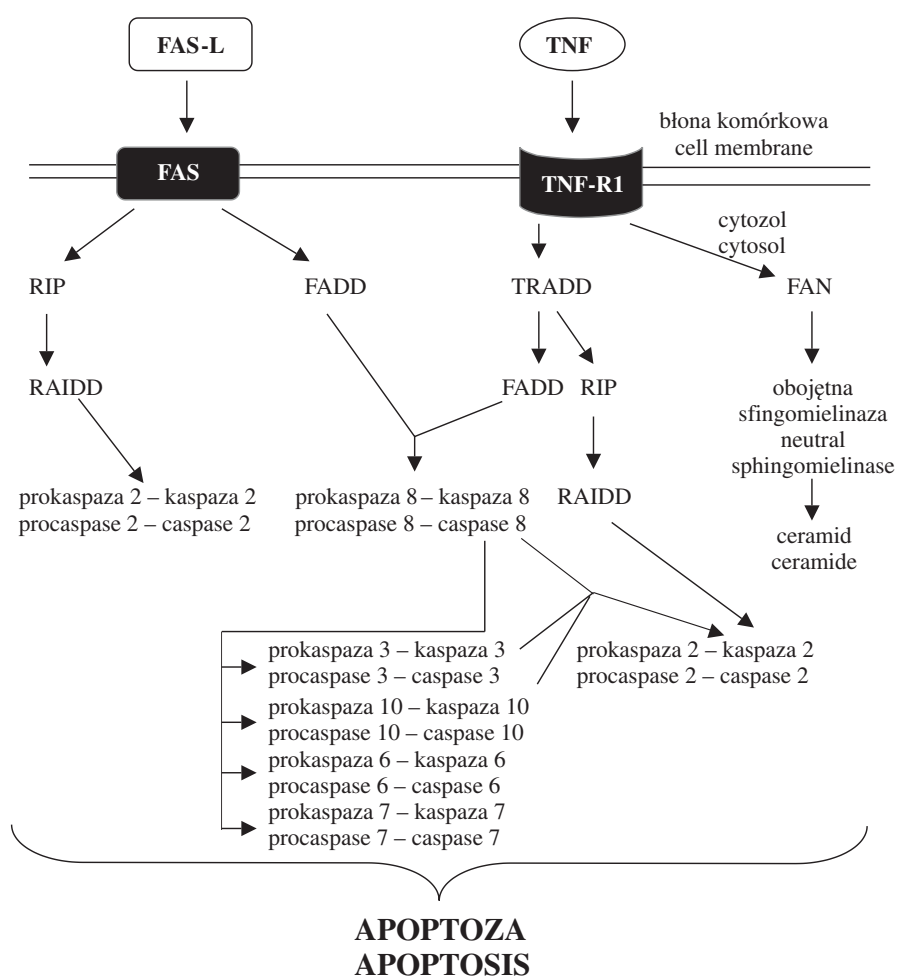
Białka adaptorowe

W przekazywaniu sygnałów z receptorów pośredniczą tak zwane białka adaptorowe. Poznane dotąd białka adaptorowe to: FADD/MORT, DAXX, TRADD, FAN, SIVA, TRAF1 i 2, RIP, CRADD/RAIDD. Niektóre z nich współdziałają zarówno z receptorem Fas, jak i receptorem TNF

(ryc. 1). Większość białek adaptorowych (z wyjątkiem FAN) ma domenę śmierci (DD – *death domain*), dzięki której oddziałują z taką samą domeną znajdującą się po cytoplazmatycznej stronie receptora [6].

Regulatory apoptozy

Wiele czynników jest zdolnych do wywołania śmierci komórek. Mogą to być związki zaburzające cykl komórkowy, brak czynników wzrostu, szok termiczny, stres oksydacyjny, aktywacja określonych receptorów, związki uszkadzające DNA [6]. Do czynników wywołujących apoptozę należą: promieniowanie ultrafioletowe i promieniowanie γ , gdyż generują one powstawanie reaktywnych form tlenu, tj. H_2O_2 oraz OH^\bullet , wolne rodniki powodujące uszkodzenia DNA, niedobór czynników wzrostu, np.: IL-2 czy IL-6, co prowadzi do zahamowania podziałów, wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , metanol, azydek sodu, aktynomycyna D, kolchicyna – winkrystyna – winblastyna, które hamują cykl komór-



Ryc. 1. Stymulacja błonowych receptorów śmierci FAS i TNF-R1 prowadząca do apoptozy [wg 6, 7]

Fig. 1. Stimulation of FAS and TNF-R1 death receptors providing to apoptosis [see 6, 7]

kowy, obniżenie syntezy glutationu, N-acetylosfin-gozyna, rapamycyna [5, 9, 23].

Czynnikami antyapoptotycznymi są między innymi: EDTA, DTPA, TEMPO, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IL-2, SCF, IL-3, IL-5, IL-10, N-(2-merkaptoetylo)1,3-propanodiamina oraz białko hsp 70, hamujące apoptozę spowodowaną stresem oksydacyjnym [4, 10].

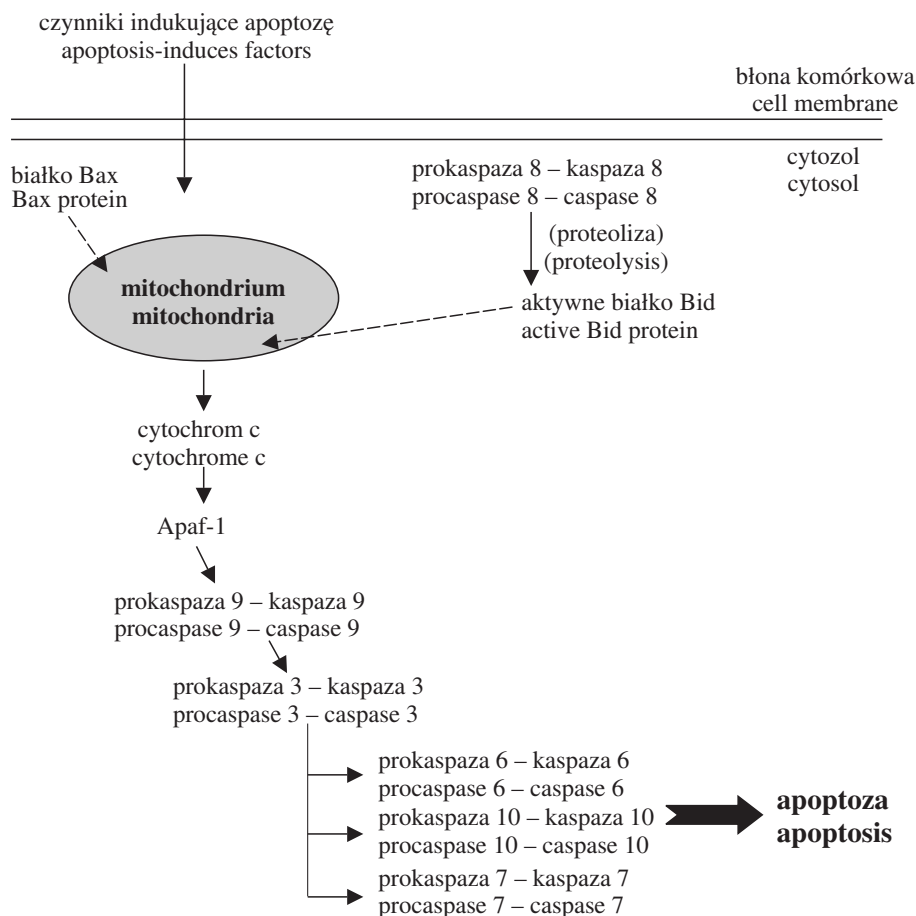
Wirusy syntetyzują białka, które mogą być bądź aktywatorami apoptozy, bądź też jej inhibitorami. Wśród wirusowych inhibitorów apoptozy wyróżnia się: białko Crm A (*cytokine response modifier*) wirusa ospy, które hamuje kaspazy w różnych fazach apoptozy, białko IAP, białko p53 bakulowirusów, białka adenowirusów, tj: E1B19K – funkcjonalny homolog Bcl-2, E1B55K – inhibitor p53 oraz E3-14.7K powodujący blokowanie indukcji receptora TNF oraz uwalnianie kwasu arachidonowego, SPI-2 (*vaccinia*) – inhibitor kaspaz, białko pX wirusa HBK powodujące inaktywację p53, wydzielane przez wirusa Epsteina Barr: Bhfr1 – homolog Bcl-2 oraz Lmp1, który prowadzi do aktywacji NF- κ B. Wirus KSHV produkuje ORF16 oraz Lmw-5hl, będące homologami Bcl-2 [3, 6, 7, 8, 16].

Do wirusowych czynników indukujących apoptozę należą: białko Tat wirusa HIV, które po-

woduje wzmożone wytwarzanie ligandu dla receptora Fas, białko Tax wirusa HTLV-1 oraz duży antygen T wirusa SV40, który promuje syntezę białka p53 (tab. 3).

Wśród infekcji wirusowych apoptoza odgrywa szczególną rolę w zakażeniach wirusem HIV, obserwuje się bowiem upośledzoną odporność na skutek apoptozy limfocytów CD4⁺ i CD8⁺, które wykazują nasiloną ekspresję receptora Fas (CD95) i wzmożoną wrażliwość na Fas-L. Wirus HIV aktywuje syntezę białka p53, co prowadzi do wypływu cytochromu c oraz AIF z mitochondriów. W przebiegu zakażenia HIV obserwuje się ponadto upośledzenie syntezy przez limfocyty Th1 niektórych cytokin o działaniu antyapoptotycznym: IL-2, IL-12 [12, 15].

W regulacji apoptozy uczestniczy również białko FLIP (*FLICE – inhibitory protein*, określane czasem jako: CASPER, FLAME, CASH I-FLICE, MRIT), charakteryzujące się obecnością w N-końcu dwóch efektorowych domen śmierci DED (*death effector domain*), przez którą łączy się z taką samą domeną obecną na innych białkach. Końiec C charakteryzuje się podobieństwem sekwencji do prodomeny kaspazy 8 i 10. Białko to nie ma aktywności enzymatycznej i istnieją sugestie, że



Ryc. 2. Alternatywna mitochondrialna droga apoptozy [wg 14]

Fig. 2. Alternative mitochondrial pathway of apoptosis [see 14]

Tabela 3. Przykłady czynników pro- oraz antyapoptotycznych [wg 10, 23]**Table 3.** Examples of proapoptotic and antiapoptotic factors [see 10, 23]

Niektóre czynniki wywołujące apoptozę (Some of proapoptotic factors)	Niektóre czynniki hamujące apoptozę (Some of antiapoptotic factors)
Ozon	etylenodiaminotetraoctan (EDTA)
Tlenek azotu (w małym stężeniu)	dietylotetraaminopenta – octan (DTPA)
Deksametazon	2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl (TEMPO)
Etopozyd	N-t-butylo-fenylonitron (PBN)
Tapsygargina	kurkumina
Leki cytotoksyczne – kamptotecyna, melfalan, chlorambucyl	katalaza
N-acetylosfingozyna	glutation
Cyjanki	witamina E
Kwas retinoidowy	tiodoksyna
cis-diaminochloroplatyna	dietyloditiokarbaminian
Promieniowanie nadfioletowe	penicyloamina
Promieniowanie jonizujące	dysmutaza ponadtlenkowa
Duży antygen T wirusa SV40	N-(2-merkaptoetylo)1,3-propanodiamina
Daunomycyna	wirusowy czynnik E1B-19K
Akroleina	wirusowy czynnik E1B-55K
Antracykliny	wirusowy czynnik E3-14.7K
Bleomycyna	wirusowy czynnik Bhf1
Wirusowe białko Tat	wirusowy czynnik Lmp1
Wirusowe białko Tax	wirusowy czynnik SPI-2

może działać jako czynnik pro- lub antyapoptotyczny [6, 8, 19].

Białko Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) jest białkiem należącym do induktorów apoptozy. Na końcu N zawiera domenę CARD, która umożliwia oddziaływanie z innymi kaspazami, mającymi tzw. dużą prodomenę. Na końcu C znajduje się domena umożliwiająca oddziaływanie z cytochromem c (domena bogata w powtórzenia WD ok. 40), a także miejsce wiązania dATP lub ATP. Po związaniu dATP oraz cytochromu c białko Apaf1 za pośrednictwem domeny CARD łączy się z prokaspazą 9 (ryc. 2) [24].

Rodzina białek bcl-2

Białka należące do tej rodziny mogą działać pro- lub antyapoptotycznie i tworzyć homo- lub heterodimery [2, 7, 8]. Podobnie jak kaspazy, białka należące do rodziny białek bcl-2, również mają pewną homologię. Porównanie sekwencji tych białek doprowadziło do wyróżnienia 4 konserwatywnych obszarów, tzw. domen BH (*Bcl-2 homology domain*), tj.: BH1, BH2, BH3, BH4. Wśród proapoptotycznych członków rodziny bcl-2, domena BH3 okazała się bardzo ważna zarówno dla dimeryzacji z innymi członkami tej rodziny, jak i dla indukcji apoptozy. Większość białek rodziny bcl-2 ma hydrofobowy koniec C, który umożliwia im przyłączenie się do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Białka, które nie mają tej domeny, np. białka cytozolowe Bad czy Bid, mogą przemieszczać się do mitochondriów przez asocjację z innymi białkami lub w wyniku tworzenia kompleksów z białkami należącymi do tej rodziny. Taka heterodimerska asocjacja, a następnie translokacja jest regulowana przez fosforylację (np. fosforylacja białka Bad hamuje jego asocjację z Bcl-L oraz Bcl-2).

Do antyapoptotycznych białek należą: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Nr13, A1/Bft-1, które zazwyczaj hamują aktywację kaspaz. Z kolei do białek proapoptotycznych należą: Bax, Bak, Diva, Bad, Bcl-xs, Bik, Bim, Hrk, Nip3, Nix, Bid. Zarówno jedno, jak i drugie są niezbędne do normalnego rozwoju komórek oraz do utrzymania homeostazy organizmu. Po raz pierwszy gen dla białka Bcl-2 zlokalizowano w chromosomie [t(14:18) (q32;q21)] w ludzkiej ziarnicy złośliwej, gdzie białko Bcl-2 wspomagało onkogenezę w wyniku supresji apoptozy. Od stosunku białek pro- i antyapoptotycznych zależy, czy komórka ulegnie apoptozie. Ostatnie badania sugerują, że białka te mogą być regulowane w wyniku modyfikacji posttranslacyjnej, co świadczy o tym, że są to białka zależne od środowiska, w jakim znajduje się komórka [7]. Wykazano np. że białko Bcl-2 współdziała w regulacji z białkiem Bax. Obydwa białka wykazują duże podobieństwo w sekwencji aminokwasów i tworzą ze sobą kompleksy. Jeśli w komórce jest nadmiar białka Bcl-2, to łączy ono całą pulę białka Bax, a pozostałe białko Bcl-2 tworzy homodimery (może również zaistnieć sytuacja odwrotna, gdy nadmiar białka Bax łączy całą pulę białka Bcl-2, a pozostała reszta Bax tworzy homodimery). Najlepiej zidentyfikowanym białkiem z tej rodziny jest białko Bcl-2, zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, błonie jądrowej i częściowo w siateczce śródplazmatycznej [9, 16]. Białko Bax jest białkiem cytozolowym, przemieszcza się do mitochondriów,

umieszcza w zewnętrznej ich błonie i osiąga aktywną konformację i/lub oddziałuje z białkami tej błony tworząc pory, przez co uwalnia cytochrom c z przestrzeni międzykomórkowej [8]. Białko Bid do swojej proapoptotycznej funkcji wymaga proteolizy przez kaspazę 8. Jest to peptyd o masie cząsteczkowej 15 kDa, który w wyniku aktywacji przedostaje się z cytozolu do mitochondrów i uwalnia cytochrom c, zmieniając przepuszczalność błony mitochondrialnej, prawdopodobnie współdziałając przy tym z białkiem Bax [8]. Białka Bak i Bax mogą łączyć się z innym białkiem umiejscowionym w zewnętrznej błonie mitochondrium, określanym nazwą VDAC (*voltage dependent anion channel* – kanał błonowy, który może być zamykany i otwierany m.in. przez zmiany napięcia elektrycznego i polianiony). VDAC jest jednym z głównych składników zewnętrznej błony mitochondrialnej komórek eukariotycznych. W normalnych warunkach VDAC jest nieprzepuszczalny dla cytochromu c, ale po połączeniu z białkami Bax i Bak powoduje powstanie kanału błonowego, przepuszczającego cytochrom c do cytoplazmy. Białko Bcl-2 działa odwrotnie – po przyłączeniu do VDAC zamyka jego światło, co prowadzi do zatrzymania śmiertelnościowego cytochromu wewnątrz mitochondrium [15].

Apoptoza leukocytów

Apoptoza leukocytów może być jednym z powodów zmniejszenia ich ogólnej liczby i odporności immunologicznej, co wiąże się z ryzykiem zakażenia, zachorowaniem na raka lub chorobami autoimmunologicznymi [25]. Jest istotnym mechanizmem homeostatycznym w obrębie układu immunologicznego, który utrzymuje pulę limfocytów na odpowiednim poziomie. Odpowiada między innymi za samoeliminację limfocytów w grzysicy (pozytywna i negatywna selekcja) czy za pozbywanie się limfocytów ulegających proliferacji pod wpływem antygeny [9, 11].

Dojrzałe neutrofile mają najkrótszy czas przeżycia wśród leukocytów, gdyż cała populacja neutrofilów ulega apoptozie w ciągu 72 godzin. Pełnią one istotną rolę w organizmie człowieka, a ich liczba zwiększa się w zakażeniu pasożytami i bakteriami. W obecności N6-hydroksy-L-argininy, w wyniku mechanizmu zależnego od NOS (syntaza tlenu azotu) produkują one tlenek azotu, który jest cząsteczką sygnałową, arylosulfatazę oraz histaminazę, które degradują mediatory zapalne [26]. Pewne cytokiny, tj.: GM-CSF, G-CSF, IL-1 β , TNF- α czy IFN- γ , podobnie jak IL-2, przedłużają czas życia neutrofilów i opóźniają ich apoptozę.

Ponadto substancje, takie jak: LPS, składnik C5a dopełniacza, FMLP (N-formylo-L-metionyl-leucylofenyloalanina) – chemoatraktant, czy też katalaza, opóźniają apoptozę neutrofilów o ponad 24 godziny. Obrona przed apoptozą przez te cytokiny wiąże się z indukcją syntezy RNA oraz białek, a także w przypadku GM-CSF z wpływem na fagocyty, których funkcja – wchłanianie apoptotycznych neutrofilów – jest modulowana przez tę cytokinę [10]. Glutathion, jeden z ważniejszych antyoksydantów, może również wpływać na przeżycie i potencjał zapalny neutrofilów. Podobnie jak GM-CSF, na neutrofile działa dibutyrylocAMP, który hamuje ich apoptozę. Również prostaglandyna E2 (PGE2) wpływa na aktywację neutrofilów i hamuje ich apoptozę. Jednak Misso et al. [27] nie zauważyli hamującego jej wpływu na ten proces, co mogło mieć związek ze stężeniem, jakiego użyli w swoim badaniu (10 nM PGE2). W badaniach innych autorów PGE2 oraz 11-deoksy-PGE1 hamowały apoptozę neutrofilów w stężeniu odpowiednio 1 i 10 μ M. Działanie tych większych stężeń PGE2 prawdopodobnie ma związek ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP oraz aktywacją kinazy białkowej typu I zależnej od cAMP. Misso et al. zauważyli także, że stężenie PGE2 (10 nM) znacząco hamowało apoptozę eozynofilów, co wskazuje na ich wrażliwość na te substancje [27]. Mimo że neutrofile same produkują tlenek azotu, to jednak egzogeny NO dostarczany od donorów *NO może wzmacniać apoptozę neutrofilów.

Apoptoza neutrofilów odgrywa ogromną rolę w kontroli uszkodzeń tkanki i nacieku komórek, gdyż neutrofile ulegając apoptozie, tracą możliwości chemotaktyczne, po czym następuje ich degranulacja. Przedłużony okres życia i aktywacja neutrofilów natomiast prowadzi do chronicznego stanu zapalnego i uszkodzenia tkanki.

Eozynofile odgrywają rolę w reakcji zapalnej typu późnego, w chorobach alergicznych, np. astmie oskrzelowej, chorobie atopowej i w inicjacji kontroli odpowiedzi immunologicznej. Świeżo wyizolowane eozynofile ulegają apoptozie po 3–4 dniach inkubacji; w obecności IL-5 żyją dłużej, gdyż cytokina ta przedłuża ich żywotność nawet o 80 godzin. Podobnie działa IL-3 oraz GM-CSF. Jednak, jak wykazali Simon et al., inkubacja eozynofilów przez 30 min z GM-CSF nie powodowała przedłużenia okresu ich przeżycia, co świadczy o tym, że inhibicja apoptozy następuje tylko przy stałej obecności tego czynnika [28]. Leczenie glukokortykosteroidami prowadzi zwykle do obniżenia liczby eozynofilów i obniżenia stężenia IL-5 w surowicy u chorych na astmę [10, 28]. Apoptozę eozynofilów można wywołać traktując je TGF- β 1.

Monocyty ulegają apoptozie, jeśli nie są stymulowane w odpowiedni sposób. Cytokiny prozapalne, tj.: IL-1 β , IL-8, TNF- α oraz GM-CSF, które warunkują prawidłowe funkcjonowanie monocytów, są produkowane przez aktywowane monocyty, co wskazuje na możliwość zarówno autokrynej, jak i parakrynej kontroli ich przeżycia w przypadku odpowiedzi immunologicznej. Ponadto TNF- α hamuje apoptozę w hodowlach dojrzałych monocytów *in vitro* [10].

Limfocyty B – komórka pro-B powstająca z komórki pnia podlega apoptozie wtedy, gdy ulegnie nieprawidłowej ekskluzji allelicznej (rekombinacja VDJ). Kolejne stadium, podczas którego może dochodzić do apoptozy limfocytów B, zachodzi wówczas, gdy niedojrzała komórka B jako receptor ma jedynie monomeryczną IgM i gdy rozpoznaje własne antygeny organizmu [11]. Vit et al. zauważyli, że aby wywołać apoptozę ludzkich B-limfoblastów zależną od receptora Fas, jest wymagana aktywność kaspazy 8, lecz w przypadku apoptozy, spowodowanej promieniowaniem jonizującym czy też mitomycyną C, aktywność ta nie jest konieczna. Badania te wskazują, że w odpowiedzi na uszkodzenie DNA aktywacja kaspazy 8 jest niezależna od połączenia receptora Fas z ligandem. Droga prowadząca do aktywacji kaspazy 8 po ekspozycji na promieniowanie jonizujące bezpośrednio zależy od postmitochondrialnej aktywności, podczas gdy indukowanie mitomycyną C może angażować zarówno aktywację receptora Fas bez przyłączenia ligandu, jak i postmitochondrialną aktywację proteazy Z-VAD fmbc [17].

Limfocyty T ulegają fizjologicznej apoptozie podczas pozytywnej i negatywnej selekcji w grasicy. Selekcja pozytywna odbywa się w korze grasicy i polega na tym, że przeżywają tylko komórki rozpoznające antygeny zgodności tkankowej (MHC). Selekcja negatywna polega na tym, że w rdzeniu grasicy apoptozie ulegają limfocyty T, które rozpoznają i reagują na antygeny własne organizmu [11]. Apoptozie ulegają również limfocyty T starzejące się, które charakteryzują się zahamowaniem podziałów, skróceniem długości telomerów, zmniejszeniem liczby receptorów: CD28 (bardzo istotny do zapoczątkowania stymulacji wymaganej do proliferacji i odpowiedzi komórek T), CD40L (CD154) oraz CD134. Limfocyty T starzejące się mają większą ekspresję CD95, ale zmniejsza się ona u ludzi po 75. roku życia, z kolei młode limfocyty T wykazują jedynie 12% ekspresji antygeny CD95 w porównaniu z limfocytami dojrzałymi [25, 29]. W apoptozie dojrzałych limfocytów T bierze udział głównie receptor Fas oraz TNF-R1 [20]. Dojrzałe limfocyty T są bardzo wrażliwe na apoptozę indukowaną TNF- α . Na wzrost potencjału apoptotycznego wpływa ponadto obniżona aktywność GSH [19, 25], a także nadekspresja białka Ras, która prowadzi do wzrostu ekspresji ligandu dla receptora Fas, prawdopodobnie przez aktywację kinazy MAP oraz w wyniku synergizmu z innymi czynnikami stymulującymi. Białko Ras może również wzmacniać apoptozę przez indukcję autokrynej aktywacji receptora Fas [30].

Piśmiennictwo

- [1] Goldsworthy TL, Conolly RB, Fransson-Steen R: Apoptosis and cancer assessment. *Mut Res* 1996, 365, 71–90.
- [2] Honing LS, Rosenberg RN: Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 2000, 108, 317–330.
- [3] Bosć L, Hortelano S: Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal* 1999, 11, 239–244.
- [4] Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG: Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 2000, 257, 58–66.
- [5] Fellsrtöm B, Zezina L: Apoptosis: friend or foe? *Transplant Proceed* 2001, 33, 2421–2416.
- [6] Grzelakowska-Sztabert B: Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej przez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Bioch* 1998, 44, 8–21.
- [7] Rinkenberger JL, Korsmeyer SJ: Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Genet Dev* 1997, 7, 589–596.
- [8] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Apoptosis: definition, mechanism and relevance to disease. *Am J Med* 1999, 107, 489–506.
- [9] Sikora E: Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy). *Post Bioch* 1994, 40, 150–160.
- [10] Yoshida Y, Anzai N, Kawabata H: Apoptosis in normal and neoplastic hematopoiesis. *Crit Rev Oncol/Hematol* 1996, 24, 185–211.
- [11] Ptak W, Ptak M: Limfocyty B i T oraz ich subpopulacje. W: *Podstawy immunologii*. Red.: Węgińska D, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2000, wyd. II, 81–90.
- [12] McConkey DJ, Zhivotovsky B, Orrenius S: Apoptosis – molecular mechanism and biomedical implications. *Mol Asp Med* 1996, 17, 1–110.
- [13] Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp, Bruschi W: Dose-response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis. *Mut Res* 2000, 464, 13–18.
- [14] Behl C: Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neur Transm* 2000, 107, 1325–1344.
- [15] Szpringer E, Lutnicki K: Znaczenie apoptozy w wybranych chorobach w dermatologii. *Nowa Med* 2002, 3, 24–32.

- [16] **Bär PR:** Apoptosis – the cell's silent exit. *Life Sci* 1996, 59, 369–378.
- [17] **Vit JP, Guillouf C, Rosselli F:** Futile caspase-8 activation during the apoptotic cell death induced by DNA damaging agents in human B-lymphoblasts. *Exp Cell Res* 2001, 269, 2–12.
- [18] **Sikora E:** Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. *Post Bioch* 1996, 42, 108–113.
- [19] **Gupta S, Chiplunkar S, Kim C, Yel L, Gollapudi S:** Effect of age on molecular signaling of TNF-induced apoptosis in human lymphocytes. *Mech Age Dev* 2003, 123, 503–509.
- [20] **Winoto A:** Cell death in the regulation of immune responses. *Immunology* 1997, 9, 365–370.
- [21] **Alexandroff AB, Jackson AJ, Paterson T, Haley JL, Ross JA, Longo DL, Murphy WJ, James K, Taub DD:** Role of CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol Immunol* 2000, 37, 515–526.
- [22] **Hollmann AC, Gong Q, Owens T:** CD40-mediated apoptosis in murine B-lymphoma lines containing mutated p53. *Exp Cell Res* 2002, 280, 201–211.
- [23] **Bartosz G:** Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Bioch* 1998, 44, 22–31.
- [24] **Widlak P:** Apoptoza: nukleaza, kaspazy, cytochrom c. *Post Bioch* 1998, 44, 252–254.
- [25] **Schindowski K, Leutner S, Müller WE, Eckert A:** Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging* 2000, 21, 661–670.
- [26] **Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Dapino P, Tortolina G, Dallegrì F:** Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. *Free Rad Biol Med* 2001, 30, 161–169.
- [27] **Misso NLA, Peacock CD, Watkins ND, Thompson PJ:** Nitrite generation and antioxidant effects during neutrophil apoptosis. *Free Rad Biol Med* 2000, 28, 934–943.
- [28] **Simon HU, Blaser K:** Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol Today* 1995, 16, 53–54.
- [29] **McLeod JD:** Apoptotic capability in ageing T cells. *Mech Ageing Dev* 2001, 121, 151–159.
- [30] **Downward J:** Ras signaling and apoptosis. *Genet Dev* 1998, 8, 49–54.

Adres do korespondencji:

Kazimierz Pasternak
Katedra i Zakład Chemii Ogólnej AM
ul. Staszica 4
20-081 Lublin

Praca wpłynęła do Redakcji: 6.10.2004 r.

Po recenzji: 2.02.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 16.02.2005 r.

Received: 6.10.2004

Revised: 2.02.2005

Accepted: 16.02.2005