

BOŻENA KAMIŃSKA

*Pracownia Regulacji Transkrypcji, Zakład Biochemii Komórki,
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: bozenakk@nencki.gov.pl*

MOLEKULARNE MECHANIZMY ŚMIERCI KOMÓREK NERWOWYCH

ŚMIERĆ KOMÓREK NERWOWYCH W PROCESACH NEURODEGENERACYJNYCH — APOPTOZA CZY NEKROZA?

Choroby neurodegeneracyjne (zwyrodnieniowe mózgu) są heterogenną grupą przewlekłych schorzeń o zróżnicowanym obrazie klinicznym i odmiennym podłożu (HARDY i GWINN-HARDY 1998). Niektóre z nich, na przykład choroby Alzheimera i Parkinsona, są wyraźnie skorelowane z wiekiem i mają cechy kliniczne podobne do obrazu starzenia, przy czym różnice wydają się mieć charakter głównie ilościowy (FRIEDMAN 1993). Cechą charakterystyczną chorób neurodegeneracyjnych są zmiany morfologii bądź zanik komórek nerwowych. Przez długi czas sądzono, że w poszczególnych schorzeniach uszkodzane są określone typy komórek nerwowych, co sugerowało selektywną wrażliwość komórek na czynniki uszkodzające. Stwierdzono bowiem, że w chorobie Parkinsona zanikają komórki istoty czarnej śródmózgowia, w chorobie Huntingtona komórki jądra, zaś w chorobie Alzheimera uszkodzenia komórek lokalizowane są w hipokampie i korze czołowej. W zaawansowanych stanach chorobowych nie zawsze mamy do czynienia ze zjawiskiem selektywności: u pacjentów z chorobą Alzheimera często rozwija się choroba Parkinsona, z kolei u osób z zaawansowaną chorobą Alzheimera, Parkinsona, czy stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS) pojawia się często demencja, której towarzyszą rozległe zmiany w korze mózgowej. Jest to świadectwem uogólnionej śmierci komórek w mózgu.

Szereg danych wskazuje na to, że choć przyczyny pojawiania się chorób są bardzo różne,

podłoże zarówno przewlekłych chorób zwyrodnieniowych mózgu, jak też zmian neurodegeneracyjnych wywołanych niedotlenieniem bądź epilepsją, może być podobne. We wszystkich wymienionych schorzeniach stwierdzono zanik komórek nerwowych spowodowany śmiercią o cechach apoptozy (THOMPSON 1995, CHARRIAUT-MARLANQUE i współaut. 1996).

Stwierdzenie, czy w danej sytuacji patologicznej występuje aktywna czy też pasywna śmierć komórek ma niezwykle istotne znaczenie. Śmierć pasywna zwana nekrozą komórek ma szybki przebieg, wiąże się z całkowitym rozpadem komórki i wylaniem się jej zawartości na zewnątrz; w tej sytuacji nie ma wielkiej szansy na interwencje farmakologiczne. Jeżeli jednak komórki umierają aktywnie, w wyniku programowanej śmierci komórek (zwanej też apoptozą), proces śmierci komórkowej przebiega znacznie wolniej, gdyż musi dojść do uruchomienia pewnego programu genetycznego i syntezy lub aktywacji nowych enzymów, które wykonują „egzekucję”. Aktywna śmierć komórek przypomina lawinę, która raz uruchomiona toczy się początkowo wolno, a potem nabiera tempa stając się kataklizmem nie do zatrzymania. Do niedawno sądzono, że komórki nerwowe umierają biernie na drodze nekrozy. Obecnie wiadomo, że chorobom neurodegeneracyjnym towarzyszy indukcja programowanej śmierci komórek i to właśnie opóźniona śmierć komórek nerwowych, może być odpowiedzialna za rozległe zmiany neurodegeneracyjne. Określe-

nie rodzaju śmierci komórek i poznanie mechanizmów tego procesu stwarza potencjalnie szansę opracowania terapii blokujących śmierć

komórek bądź uruchamiających mechanizmy kompensacyjne w mózgu.

DEFEKTY GENETYCZNE JAKO PRZYCZYNA ŚMIERCI KOMÓREK NERWOWYCH W PROCESACH NEURODEGENERACYJNYCH

Intensywne badania prowadzone w ciągu ostatnich 10 lat pozwoliły na zidentyfikowanie defektów genetycznych będących bezpośrednią przyczyną niektórych chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroby Alzheimer, Parkinsona, Huntingtona, ALS, wielu zespołów ataksji. Przyczynił się do tego między innymi postęp w tworzeniu genetycznie zmodyfikowanych zwierząt. Stwierdzono, że u myszy transgenicznym będących nosicielami określonych defektów genetycznych, występują zmiany morfologiczne i zanik komórek nerwowych, podobnie jak ma to miejsce w schorzeniach neurodegeneracyjnych (DAL CANTO i GURNEY 1994, PRICE i współaut. 1998). Tabela 1 przedstawia zestawienie defektów genetycznych zidentyfikowanych w chorobach zwyrodnieniowych mózgu u człowieka i u zwierząt genetycznie zmodyfikowanych.

cursor protein). W genie kodującym białko APP zidentyfikowano szereg mutacji, które są przyczyną występowania wczesnych rodzinnych postaci choroby Alzheimer (Ryc. 1). APP jest integralnym białkiem błonowym. Enzymy o aktywności β - i γ -sekreazy przecinają APP w obrębie zaznaczonej sekwencji $A\beta$ i uwalniają fragmenty białka. Zwykle ~90% wydzielanego $A\beta$ występuje w formie rozpuszczalnego peptydu $A\beta_{40}$, a ~10% jako słabo rozpuszczalne peptydy $A\beta_{42}$ i $A\beta_{43}$, łatwo tworzące agregaty i struktury włóknkowe. Peptydy $A\beta_{42}$ i $A\beta_{43}$ są neurotoksyczne i gromadzą się selektywnie w blaszkach starczych. Mutacje w genie *APP*, takie jak mutacja szwedzka, Hendriksa i niemiecka, powodują cięcie APP głównie na peptydy $A\beta_{42}$ i $A\beta_{43}$ (LANSBURY 1997, PRICE i współaut. 1998). Wyniki badań zwierząt transgenicznym z tego typu mutacjami w genie *APP* wskazują,

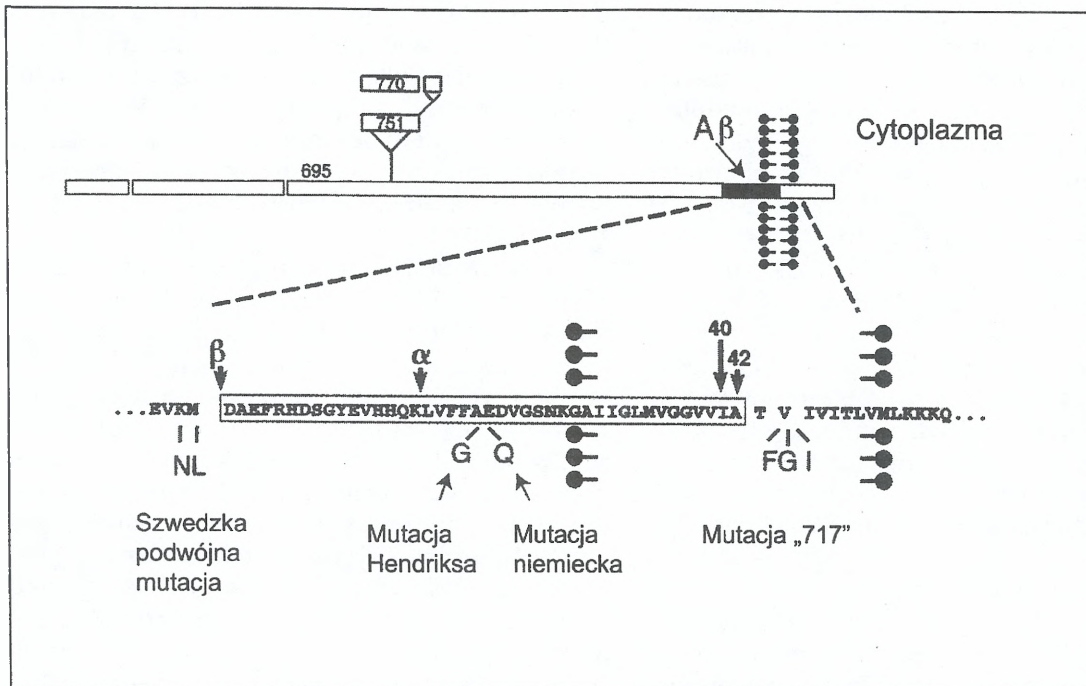
Tabela 1. Defekty genetyczne w dziedzicznych formach chorób neurodegeneracyjnych.

Choroba	Gen	Patologia	Zwierzę transgen
ch. Alzheimer	APP *	złogi amyloidu (A)	złogi amyloidu (A)
		blaszki neurofibrylarne (NT)	blaszki neurofibrylarne (NT)
ch. Parkinsona stwardnienie zanikowe boczne	Presenilina 1, 2*	A + NT	A + NT
	α -synukleina*	ciałka Lewiego	brak danych
	Dysmutaza ponadtlenkowa*	ciałka Lewiego	zaburzenia neuronów ruchowych, złogi, zanik komórek
ch. Huntingtona	Huntingtina**	złogi jądrowe	zaburzenia ruchowe, zanik komórek, złogi
Ataksja mózdkowor- dzeniowa (SCA1)	Ataksyna 1**	złogi jądrowe	ataksja, złogi jądrowe, zanik komórek,
Ataksja mózdkowor- dzeniowa (SCA3)	Ataksyna 3**	złogi jądrowe	ataksja, atrofia mózdku

*Oznaczono mutacje typu missense, zmieniające sens odczytu; ** oznaczono mutacje trzynukleotydowych powtórzeń kodujących glutaminę (ang. CAG repeats)

Wyniki badań choroby Alzheimer wskazują, że pierwotną przyczyną zwyrodnienia neuronów może być powstawanie złogów β -amyloidu ($A\beta$) i wtórne procesy neurodegeneracyjne na skutek neurotoksyczności $A\beta$ (BARCIKOWSKA 1998). β -amyloid o długości 42–43 aminokwasów jest fragmentem większego białka prekursorowego β -amyloidu (APP, ang. amyloid pre-

ze w ich mózgach gromadzą się szybko złogi $A\beta$, powstają blaszki starcze, a neurony degenerują. Podobne zmiany neurodegeneracyjne stwierdzono w mózgach myszy z defektami w genach kodujących presenilinę 1 i 2 oraz apolipoproteinę E (ApoE). Preseniliny są białkami błonowymi, których funkcja nie jeszcze dobrze poznana. Prawdopodobnie biorą udział w ob-



Ryc. 1. Schemat obróbki białka prekursorowego β-amyloidu (APP).

róbce APP oraz w regulacji homeostazy wapniowej w komórce (PRICE i współaut. 1998). Ekspresja zmutowanych wariantów preseniliny w komórkach zwiększała powstawanie neurotoksycznych form Aβ. Apolipoproteina E jest głównym białkiem w surowicy krwi zaangażowanym w transport i metabolizm cholesterolu. Nie wiadomo dokładnie, jaka jest rola ApoE w regulacji obróbki APP. Postuluje się, że białko ApoE może regulować agregację wydzielanego Aβ lub usuwanie agregatów (PRICE i współaut. 1998).

Około 10% przypadków stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) ma charakter dziedziczny i w grupie tej często wykrywa się mutacje w genie kodującym dysmutazę ponadtlenkową (SOD) (WONG i BORCHELT 1995). Jest to enzym, który eliminuje groźne dla komórki wolne rodniki tlenowe. Defekty tego enzymu powodują wzrost poziomu wolnych rodników, co uszkadza zwłaszcza funkcje mitochondriów. U myszy transgenicznych ze zmutowanym genem SOD dochodzi do degeneracji neuronów ruchowych, której towarzyszą zaburzenia cytoszkieletu ko-

mórek i ich wakuolizacja (GURNEY 1994, WONG i BORCHELT 1995, WONG i współaut. 1997).

W chorobie Huntingtona i kilku zespołach ataksji rdzeniowo-mózdkowych stwierdza się degenerację komórek nerwowych w określonych strukturach mózgu. Wspomnianym chorobom towarzyszy obecność agregatów zawierających białka o zaburzonej strukturze (ang. misfolded) oraz ubikwitynę. Zwykle agregaty białek występują w jądrze komórkowym uszkodzonych neuronów. Przyczyną takich zmian są defekty genetyczne polegające na powieleniu trójki nukleotydów CAG kodujących glutaminę (KLOCKGETHER i EVERT 1998). Na przykładzie zwierząt transgenicznych wykazano, że pojawienie się wielokrotnych powtórzeń glutaminy w białku huntingtina sprawia, że białko to nagromadza się w cytoplazmie i jądrze komórkowym w formie agregatów (inkluzji) z białkiem ubikwityny. Podobne jądrowe agregaty obserwowano w tkankach pacjentów z chorobą Huntingtona i różnymi zespołami ataksji (KOSHY i ZOGHBI 1997). Sugeruje się, że zmutowane białka lub ich agregaty mogą być toksyczne dla komórek nerwowych (PRICE i współaut. 1998).

EKSCYTOTOKSYCZNOŚĆ A METABOLIZM ENERGETYCZNY W KOMÓRKACH NERWOWYCH

GLUTAMINIAN JAKO INDUKTOR APOPTOZY

Glutaminian jest głównym neuroprzekaznikiem w centralnym układzie nerwowym, pobu-

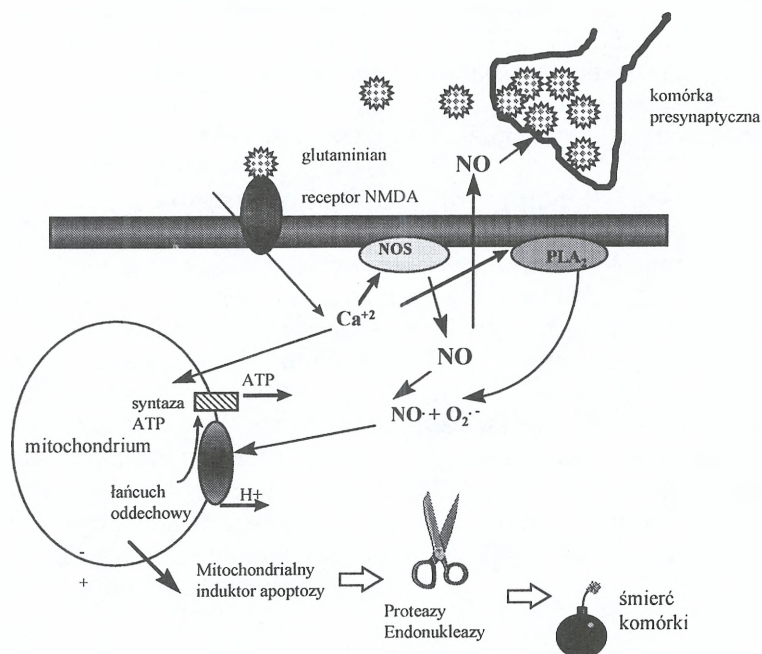
dżającym neurony za pośrednictwem specyficznych receptorów. W 1969 roku OLNEY przedstawił dane świadczące o cytotoksycznym działaniu glutaminianu (GLU). Powstała wówczas hipoteza ekscytotoksyczności wiążąca degenerację

komórek nerwowych z nadmiernym i przedłużonym pobudzeniem receptorów aminokwasów pobudzających (OLNEY 1969, 1989). W następstwie eksperymentalnie wywołanego niedotlenienia mózgu (ischemii) lub hipoglikemii, obserwowano wzrost poziomu glutaminianu w uszkodzonych strukturach. Na przykład u ludzi z ischemią podwyższony poziom GLU utrzymywał się przez 6 godzin, a w przypadku progresywnego, ischemicznego udaru przez 24 godziny (DAVALOS i współaut. 1997).

Wyniki badań nad ekscytotoksycznością sugerują, że w czasie rozpadu niektórych komórek nerwowych dochodzi do wypływu ich zawartości do otoczenia oraz uwolnienia zmagazynowanego w pęcherzykach synaptycznych aminokwasów pobudzających glutaminianu i asparaginianu. Stwierdzono, że nadmierna stymulacja receptorów GLU może prowadzić do śmierci dalszych komórek na zasadzie reakcji łańcuchowej. Wzrost ilości neuroprzekaźnika i w konsekwencji nadmierne pobudzenie receptora GLU prowadzi do napływu jonów wapnia i aktywacji syntazy tlenku azotu (NO) oraz aktywacji fosfolipazy A₂ w komórkach nerwowych (Ryc 2). Pobudzenie fosfolipazy A₂ powoduje powstanie między innymi wolnych rodników tlenowych, które uszkadzają funkcje mitochondriów, a zwłaszcza zaburzają działanie łańcucha odde-

chowego. Powstający równolegle NO tworzy z tlenem toksyczne pochodne, które także upośledzają metabolizm energetyczny mitochondriów (BONFOCO i współaut. 1995). Wykazano, że zarówno niedobór tlenu, jak też obniżenie poziomu glukozy *in vivo* i *in vitro*, powodują wzrost poziomu wolnych rodników (LEIST i NICOTERA 1998).

Zaburzenie metabolizmu energetycznego w mitochondriach prowadzi do obniżenia poziomu ATP i zaburzenia działania pomp jonowych błony plazmatycznej. Konsekwencją tego jest otwarcie zależnych od napięcia kanałów jonowych i dalszy napływ jonów wapnia do komórek. W badaniach przeprowadzonych na neuronach hodowanych *in vitro* wykazano, że w zależności od stopnia pobudzenia komórek przez glutaminian może dojść do nekrozy lub apoptozy (ANKARCRONA i współaut. 1995). W przypadku drastycznego pobudzenia receptorów NMDA dochodzi do napływu jonów wapnia, czemu towarzyszy napływ jonów sodowych i chlorkowych. To pociąga za sobą napływ wody, pęcznienie i lizę komórek. Śmierć ma wówczas charakter nekrotyczny i powoduje tworzenie ogniska zapalnego i liczne wtórne uszkodzenia komórek. Jeżeli bodziec negatywny był słabszy i nie dochodzi do tak drastycznego zaburzenia metabolizmu energetycznego, podwyższenie



Ryc. 2. Postulowany mechanizm ekscytotoksyczności.

Nadmierna stymulacja receptorów NMDA przez glutaminian prowadzi do napływu jonów wapnia i aktywacji syntazy tlenku azotu (NO) i fosfolipazy A₂. Powoduje to powstanie wolnych rodników tlenowych, które uszkadzają funkcje mitochondriów. Powstający równolegle NO tworzy z tlenem toksyczne pochodne, które także upośledzają metabolizm energetyczny mitochondriów. NO może też oddziaływać na komórkę presynaptyczną i pobudzać uwalnianie glutaminianu.

poziomu wapnia w cytoplazmie indukuje proces programowanej śmierci komórek. Dochodzi wówczas do aktywacji swoistych endonukleaz (enzymów degradujących DNA) oraz proteaz (enzymów degradujących białka), których wspólne działanie powoduje fragmentację jąder komórkowych i całych komórek (SCHWARTZ i MILLIGAN 1996, STELLER 1995). Fragmenty komórki pozostają otoczone błoną, dzięki czemu nie dochodzi do uszkodzania komórek sąsiadujących i powstania reakcji zapalnej (LEIST i NICOTERA 1998).

W ten sposób stopień zaburzenia metabolizmu energetycznego w wyniku nadmiernego pobudzenia komórek przez GLU determinuje stopień i sposób śmierci komórek nerwowych. Niezależnie od tego, czy komórki nerwowe umierają na drodze nekrozy lub apoptozy, konsekwencją jest zanik komórek nerwowych i zaburzenie funkcjonowania mózgu. Badania *in vitro* nad śmiercią neuronów pod wpływem GLU dowodzą, że wstępny etap obu procesów może być podobny, a rodzaj śmierci zależy od dawki GLU i od stopnia zaburzenia metabolizmu energetycznego. Jeżeli dochodzi do trwałego zahamowania funkcji mitochondriów, w konsekwencji komórka umiera na drodze nekrozy. Jeżeli komórki powracają do stanu równowagi energetycznej, dochodzi do indukcji swoistego programu apoptozy: aktywacji endonukleaz i swoistych proteaz (ANKARCRONA i współaut. 1995, BONFOCO i współaut. 1995).

ROLA MITOCHONDRIOW W AKTYWACJI KASKADY KASPAZ

Mitochondria wydają się pełnić istotną rolę w regulacji apoptozy (KROEMER 1997, ELLERBY i współaut. 1997, GREEN i REED 1998). Jedną z najwcześniej obserwowanych zmian zachodzących w mitochondriach po stymulacji komórek do śmierci, jest spadek potencjału $\Delta\psi_m$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Następuje on na długo przedtem zanim pojawi się fragmentacja DNA i wszystkie morfologiczne zmiany wyróżniające komórkę apoptotyczną. Uważa się, że krótkotrwały spadek potencjału nieodwracalnie prowadzi do apoptozy (GREEN i REED 1998).

Przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym powoduje wypompowanie protonów z matryks mitochondrialnej i prowadzi do tworzenia się potencjału błonowego, który stanowi siłę napędową do syntezy ATP. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest w normalnych warunkach nieprzepuszczalna dla jonów. Uprzepuszczalnienie błony powoduje spadek potencjału błonowego $\Delta\psi_m$. Przyczyn tego zjawiska upatruje się w otwarciu megakanalu (ang. PT pore, per-

meability transition pore). Megakanal jest kompleksem białek, na który składa się: translokacja nukleotydów adeninowych (AdNT), poryna zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz inne białka (ZORATTI i SZABO 1995). Konsekwencją otwarcia megakanalu jest przerwanie łańcucha oddechowego, zaprzestanie syntezy ATP, wpływ jonów wapnia, uwolnienie zapasów zredukowanego glutationu i NAD(P)H₂. Ponadto, otwarcie megakanalu umożliwia swobodny wpływ z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów białek, które w normalnych warunkach nie mają możliwości znalezienia się na terenie cytoplazmy (SCARLETT i MURPHY 1997, GREEN i REED 1998, KAMIŃSKA i STAŃCZYK 1998).

Opisano dwa białka uwalniane przez mitochondria w trakcie otwarcia megakanalu i będące induktorami apoptozy — AIF (ang. apoptosis inducing factor) i cytochrom c (LIU i współaut. 1996, LI i współaut. 1997). Białko AIF (czynnik indukujący apoptozę) jest uwalniane przez mitochondria komórek apoptycznych i wywołuje fragmentację DNA w izolowanych jądrach komórkowych w czasie krótszym niż 15 minut (KROEMER 1997). AIF jest flawoproteina, która przemieszcza się z mitochondriów do jądra komórkowego po indukcji apoptozy i bezpośrednio powoduje zmiany chromatyny oraz cięcie DNA na duże fragmenty (SUZIN i współaut. 1999). Działanie AIF na chromatynę jest niezależne od aktywacji kaspaz. Obok AIF uwalniany jest z mitochondriów cytochrom c — białko będące jednym ze składników łańcucha oddechowego. LI i współautorzy (1997) wykazali udział cytochromu c w aktywacji kaskady kaspaz (zob. niżej), która prowadzi do fragmentacji DNA i śmierci komórki. Potencjalny przebieg zdarzeń polega na tym, że cytochrom c, uwalniany przez mitochondria komórek pobudzonych do apoptozy, wiąże się z białkiem Apaf1 zmieniając jego konformację. Następnie w procesie zależnym od dATP powstaje kompleks białka Apaf-1 z kaspazą 9. Powstanie kompleksu cyt.c/Apaf1/kaspaza9 pozwala na indukcję proteolitycznych właściwości kaspazy 9, która aktywuje kaspazę 3 i prowadzi do fragmentacji DNA i hydrolizy białek (LI i współaut. 1997).

Inne hipotezy na temat udziału mitochondriów w procesie apoptozy dotyczą sposobu uwalniania przez mitochondria cytochromu c (REED 1997). Jedna z nich zakłada udział w tym procesie innego kanału, tworzonego przez białko Bax (białko z rodziny Bcl-2) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (VAN DER HEIDEN i współaut. 1997). Uwolnienie cytochromu c w takich warunkach nie wiązałoby się ze spadkiem potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

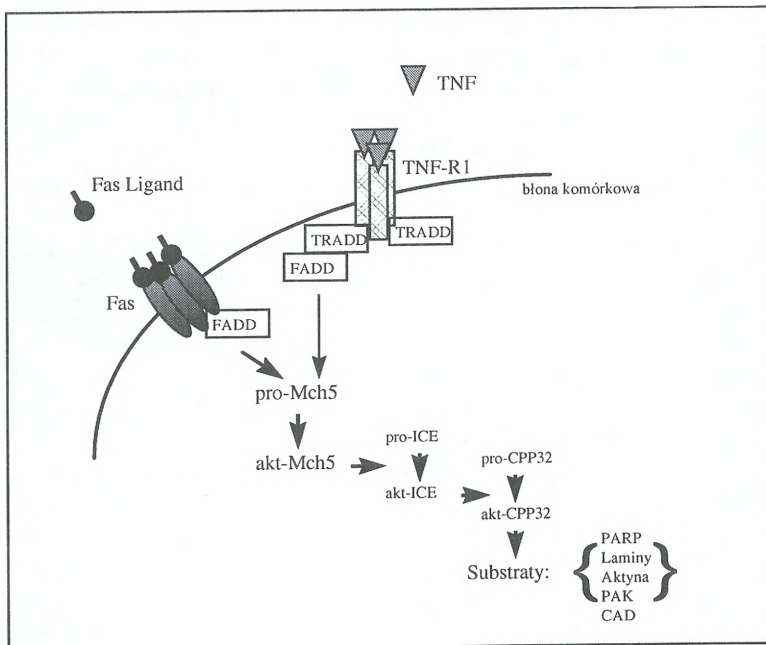
Niektóre białka z rodziny Bcl-2 mogą pełnić protekcyjną rolę w regulacji apoptozy (KLUCK i współaut. 1997). Stwierdzono, że podwyższona ekspresja genu *bcl-2* zmniejsza wrażliwość komórek na czynniki wywołujące apoptozę. Białko Bcl-2 jest zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i dzięki swej lokalizacji ma możliwość wpływania na przebieg apoptozy (ASHKENAZI i DIXIT 1998). Przypuszcza się, że może ono blokować któryś z kanałów błonowych otwieranych w trakcie apoptozy, na przykład kanał tworzony przez białko Bax (YANG i współaut. 1997, ADAMS i CORY 1998).

PROTEAZY ZAANGAŻOWANE W APOPTOZĘ I ICH SUBSTRATY

Czynniki indukujące apoptozę prowadzą do aktywacji białek z rodziny proteaz cysteinowych, zwanych kaspazami (SCHWARTZ i MILLIGAN 1996, ALNEMRI 1997). Nazwa pochodząca od ang. caspases (cysteine aspases) określa ich właściwości, gdyż są to proteazy cysteinowe trawiące białka swoiście obok reszty kwasu asparaginowego. Proteazy z rodziny ICE występują w komórkach w formie nieaktywnych proenzymów, które ulegają aktywacji proteolitycznej przez proteazy z tej samej rodziny bądź na drodze autokatalitycznej proteolizy. Mogą też aktywować inne proteazy włączając kaskadę sekwencyjnie uruchamianych proteaz (Ryc. 3). Aktywne kaspazy uczestniczą w degradacji szeregu białek takich jak: polimeraza poli[ADP-rybozy] (PARP), kinazy białkowe PAK, FAK, białko retinoblastoma-RB, laminy jądrowe (ORTH i współaut. 1996 a, b), zależna od DNA kinaza białkowa i duża podjednostka replisomu (UBE-

DA i HABENER 1997), fodryna i aktyna. PARP jest enzymem naprawy DNA i jego degradacja w czasie apoptozy może blokować próby naprawy uszkodzeń DNA. Kinazy białkowe PAK (ang. p21 Ras activated kinase) regulują między innymi aktywność kinaz z rodziny MAP oraz są ważnymi regulatorami cytoszkieletu. Kinazy FAK (ang. focal adhesion kinase) fosforylują białka znajdujące się w płytkach adhezji komórkowej i pełnią ważną rolę w przekazywaniu sygnałów inicjowanych przez integryny i neuropeptydy (ROZENGURT 1995). Proteoliza kinaz białkowych PAK i FAK przez kaspazy prowadzi do powstania ich stale aktywnych form i zaburzonej fosforylacji białek komórkowych. Wydaje się, że prowadzi to do procesów takich jak fałdowanie się błon komórkowych (ang. membrane blebbing), cofanie się wypustek i rozpad połączeń międzykomórkowych, które należą do pierwszych objawów apoptozy (RUDEL i BOKOCH 1997, LEVKAU i współaut. 1998). Z kolei degradacja aktyny i laminy jądrowej przez kaspazy, występująca na wczesnym etapie apoptozy, bądź bezpośrednio działanie kaspaz, może aktywować endonukleazę, która uczestniczy we fragmentacji jądrowego DNA na fragmenty wielkości nukleosomu i jego wielokrotności (UBEDA i HABENER 1997, TANG i KIDD 1998).

Wraz z pojawieniem się syntetycznych peptydów hamujących specyficzne proteazy możliwa stała się identyfikacja swoistych dla danego procesu proteaz. Proteazy z rodziny ICE uczestniczą w apoptozie motoneuronów w czasie rozwoju rdzenia kręgowego kurcząc (SCHWARTZ i MILLIGAN 1996), z kolei proteaza CPP-32 (kaspaza 3) odgrywa ważną rolę w śmierci komórek



Ryc. 3 Mechanizm aktywacji kaskady kaspaz.

Połączenie się trimerów liganda Fas (FasL) lub TNF ze swoistym receptorem wywołuje agregację cząsteczek receptorów i ich łączenie się z białkami adaptorowymi FADD (ang. Fas associated death domains) lub TRADD (ang. TNF receptor associated death domains). W wyniku tego dochodzi do aktywacji kaspazy Mch5 (kaspazy 8), która aktywuje kaskadę kaspaz: ICE i CPP32 (kaspaza 3) degradujących liczne substraty komórkowe.

ziarnistych mózdzku indukowanej przez usunięcie z pożywki surowicy i jonów potasu (ELDA-DAH i współaut. 1997), a obie grupy proteaz uczestniczą w uśmiercaniu oligodendrocytów przez TNF-czynnik nekrozy nowotworu (HISAHARA i współaut. 1997). Oprócz proteaz z rodziny ICE i CPP-32, także inne proteazy, takie jak kalpaina, mogą odgrywać istotną rolę w apoptozie komórek nerwowych. Kalpaina są enzymami proteolitycznymi występującymi w cytoplazmie komórek w formie nieaktywnej i ulegają aktyw-

wacji po znacznym wzroście stężenia wapnia. Wśród substratów kalpain wymienia się szereg białek cytoszkieletalnych i błonowych oraz białka regulatorowe takie jak kinaza C, fosfolipaza C, receptor rianodynowy i NMDA. Znaczny wzrost aktywności kalpain towarzyszy zmianom neurodegeneracyjnym w ischemii. Podawanie inhibitorów kalpain hamuje śmierć neuronów i ogranicza uszkodzenia mózgu (BARTUS i współaut. 1995).

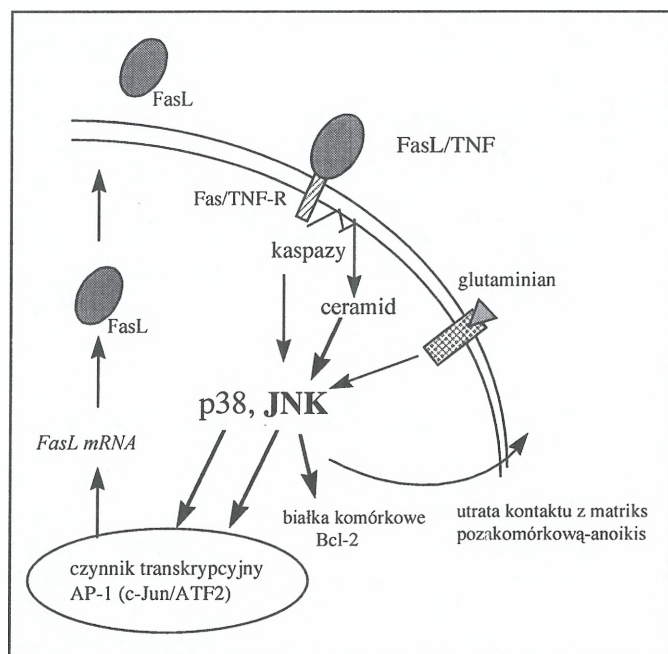
„WŁĄCZANIE” PROGRAMU APOPTOZY PRZEZ CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY AP-1 JAKO PRZYCZYNA OPÓŹNIONEJ ŚMIERCI KOMÓREK NERWOWYCH

Zgodnie z przyjętym poglądem, w zjawiskach ekscytotoksyczności takich jak ischemia śmierć neuronów spowodowana jest przedłużonym i nadmiernym pobudzeniem receptorów GLU. Jednakże podwyższony poziom GLU utrzymuje się przez kilka-kilkanaście godzin, gdy tymczasem neurony umierają często tygodnie lub miesiące od momentu zadziałania bodźca (DAVALOS i współaut. 1997). Zjawisko opóźnionej i długotrwałej śmierci neuronów może prawdopodobnie wyjaśnić hipoteza o „włączeniu” nowego programu genetycznego, który odpowiada za śmierć apoptotyczną i reprogramowanie funkcji komórek.

Programowana śmierć komórek, zgodnie z przyjętymi kryteriami, jest procesem wymagającym syntezy nowych białek i aktywacji genów. W większości przypadków obserwuje się opóźnienie lub znaczne zahamowanie samobójczej śmierci komórek przez inhibitory biosyntezy RNA lub białek. Wśród zidentyfikowanych do tej pory białek pełniących funkcję regulacyjną w procesie programowanej śmierci są także czynniki transkrypcyjne (EVAN i współaut. 1992, ESTUS i współaut. 1994, HAM i współaut. 1995). Indukowalne czynniki transkrypcyjne to białka pojawiające się w komórkach tylko w określonych sytuacjach, wiążące się w obszarach regulatorowych swoistych genów i uruchamiające syntezę konkretnego mRNA. Szereg danych wskazuje, że jednym z czynników regulujących proces apoptozy jest kompleks transkrypcyjny AP-1 (ang. activator protein-1). W skład kompleksu wchodzi białka należące do rodziny Fos i Jun. Rola kompleksu AP-1 polega na stymulacji programu genetycznego dostosowującego komórkę do określonej sytuacji fizjologicznej w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Prowadząc badania nad mechanizmem aktywacji genomu podczas pobudzenia komórek nerwowych przez kainian stwierdziliśmy, że w mózgu zwierząt dochodziło do poja-

wiania się kompleksu AP-1 w kilka godzin po wywołaniu drgawek i po przejściowym zaniku kompleksu, nagromadzał się on ponownie w kilka dni później (KAMIŃSKA i współaut. 1994). Ponadto wykazaliśmy, że drgawki indukowane przez kainian wywołują śmierć komórek nerwowych na drodze apoptozy (FILIPKOWSKI i współaut. 1994). Tak więc indukcję kompleksu AP-1 można było powiązać z zainicjowaniem apoptotycznej śmierci komórek nerwowych. W zrozumieniu roli czynnika AP-1 w apoptozie znacznie przeszkadzał fakt, że wielokrotnie wykazaliśmy jego indukcję w korze mózgowej w procesach niezwiązanych ze śmiercią komórek: w rozwoju kory mózgowej oraz po pobudzeniu sensorycznym przez bodziec wzrokowy (KAMIŃSKA i współaut. 1995, 1996). Rozwiązanie przyniosły dopiero wyniki badań nad składem białkowym czynnika AP-1 i jego zdolnością do aktywowania transkrypcji.

Wyniki naszych dalszych badań sugerują, że w trakcie apoptozy komórek glejaka dochodzi do aktywacji kinaz JNK (ang. c-Jun N-terminal kinases). Indukcja kinaz z tej rodziny prowadzi do nagromadzenia się w komórkach umierających ufosforylowanych białek c-Jun i ATF-2. Pojawienie się tak nietypowego kompleksu sprawia, że kompleks AP-1 ma zmienioną zdolność do regulacji transkrypcji różnych genów, między innymi zyskuje zdolność do aktywowania ekspresji genu *fasL* (ang. fas ligand) (Ryc. 4). Białko FasL należy do rodziny białek TNF (czynnik nekrozy nowotworu) i podobnie jak TNF jest czynnikiem indukującym apoptozę w wielu typach komórek mających na swojej powierzchni receptor, białko Fas (zwane też CD95, APO). Białko Fas w części cytoplazmatycznej ma domeny zwane „death domains”, które są odpowiedzialne za wiązanie białek adaptacyjnych uruchamiających proces śmierci. Wiązanie się FasL występującego jako trimer, indukuje trimeryzację błonowych białek Fas, co z



Ryc. 4. Aktywacja kinaz JNK i p38 w procesach apoptozy. Udokumentowane szlaki aktywacji kinaz i ich potencjalne substraty w komórkach oraz rola w indukcji ekspresji FasL.

kolei pobudza białka adaptorowe FADD (ang. Fas Associated Death Domain) i aktywuje kaspazę 8. Aktywacja tej kaspazy uruchamia kaskadę proteaz z rodziny ICE, które degradują różne substraty komórkowe. Ostatnio wykazano, że w trzech modelach apoptozy komórek nerwowych nadmierna i przedłużona aktywacja kinaz JNK powoduje wzrost ekspresji FasL i jego receptora białka Fas w umierających komórkach (LE-NIKOLESCU i współaut. 1999).

Wyniki badań przebiegu śmierci komórek nerwowych po usunięciu czynnika wzrostu nerwu (NGF), potwierdzają bezpośrednio rolę białek c-Jun i kompleksu AP-1 oraz kinaz JNK w apoptozie komórek nerwowych (KAMIŃSKA i PYRZYŃSKA 1999). Jeżeli metodami inżynierii genetycznej wyłączy się w tych komórkach czynnik AP-1 w trakcie procesu apoptozy (poprzez wprowadzenie dominującego negatywnego mutantu

c-Jun) nie dochodzi do śmierci komórek nerwowych (ESTUS i współaut. 1994, HAM i współaut. 1995). Aktywacja czynnika AP-1, a zwłaszcza akumulacja w komórkach apoptotycznych białka c-Jun, nie jest zjawiskiem ograniczonym do wymienionych sytuacji modelowych, towarzyszy również śmierci komórek nerwowych po niedokrwieniu mózgu, w chorobie Alzheimerera i Huntingtona (ANDERSON i współaut. 1996, DRAGUNOW i współaut. 1993, DRAGUNOW i Preston 1995). Stwierdzono, że w niektórych stanach patologicznych ekspresja białka c-Jun i jego ufosforylowanej formy koreluje z podwyższoną ekspresją białka FasL (HERDEGEN i współaut. 1998). Wyniki te wskazują, że procesy śmierci komórek *in vitro* odzwierciedlają procesy i mechanizmy molekularne leżące u podstaw śmierci komórek nerwowych w mózgu.

PODSUMOWANIE

Poznanie molekularnego podłoża zjawisk neurodegeneracyjnych jest niezbędnym warunkiem podejmowania działań prewencyjnych bądź leczniczych. Fakt, że apoptoza, w przeciwieństwie do nekrozy, jest procesem czasochłonnym, wymagającym często ekspresji nowych genów i białek, stwarza szereg możliwości terapeutycznych. Chociaż nie we wszystkich schorzeniach neurodegeneracyjnych śmierć komórek ma charakter wyłącznie apoptotyczny, większość badaczy zgadza się, że właśnie ten proces ma znaczenie dominujące w zjawiskach ekscytotoksyczności oraz chorobach Alzheimera,

Parkinsona, stwardnieniu rozsianym bocznym, demencjach skojarzonych z AIDS i być może w starzeniu mózgu. Choroby neurodegeneracyjne są heterogenną grupą przewlekłych schorzeń, których występowanie zwiększa się wraz z postępującym wydłużaniem długości życia społeczeństwa. Niektóre z tych chorób, na przykład chorobę Alzheimerera, wykrywa się u 5 do 10% ludzi powyżej 65 roku życia i przewiduje się, że liczba chorych może się jeszcze zwiększać. Niektórzy badacze postrzegają chorobę Alzheimerera jako chorobę przyśpieszonego starzenia mózgu i mają nadzieję, że zbadanie

patogenezy tej choroby pozwoli lepiej zrozumieć procesy starzenia się komórek w mózgu.

Wydaje się, że już wkrótce poznanie molekularnego podłoża i przebiegu apoptozy, przyczyni się do opracowania skutecznych terapii blokujących śmierć komórek, zwłaszcza w zjawiskach związanych z ekscytotoksycznością. Podejmuje się próby protekcji komórek nerwowych przed śmiercią przez stosowanie blokerów

uwalniania GLU, blokerów receptorów NMDA i kanałów wapniowych. Doświadczalnie testuje się substancje blokujące powstawanie wolnych rodników tlenowych. Zidentyfikowano kilka białek wirusowych, które są naturalnymi inhibitorami proteaz apoptotycznych z grupy ICE i obecnie przeprowadzane są próby ich wykorzystania w blokowaniu apoptozy.

MOLECULAR MECHANISMS OF NEURONAL CELL DEATH

Summary

Loss of the nervous system cells from the adult brain underlies the pathology of many neurodegenerative diseases. The question whether programmed cell death, i.e. apoptosis, underlies those processes is discussed. Some of the genetic causes of many of the primary neurodegenerative diseases are known. These diseases have many pathological mechanisms in common, but only a few pathways leading to neuronal death have been described. Specific death mechanisms based on unique neuronal features such as excitability and the occurrence of specific channels and

enzymes, have been unraveled in the brain. While multiple signals can initiate cell death, such as the removal of essential growth factors or damage by endogenous or exogenous toxins, the mechanisms of execution of cell death have a lot in common. Evolutionary conserved mechanisms involving proteases, Bcl-2-related proteins, and mitochondrial factors participate in the modulation and execution of cell death. The possible involvement of some nuclear proteins in regulation of the apoptosis related genes is discussed.

LITERATURA

- ADAMS J. M., CORY S., 1998. *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science 281, 1322–1325.
- ALNEMRI E. S., 1997. *Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases*. J. Cell. Biochem. 64, 33–42.
- ANDERSON A. J., SU J. H., COTMAN C. W., 1996. *DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay*. J. Neurosci. 16, 1710–1719.
- ANKARCRONA M., DYPBUKT J. M., BONFOCO E., ZHIVOTOVSKY B., ORRENIUS S., LIPTON S. A., NICOTERA P., 1995. *Glutamate-induced neuronal cell death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function*. Neuron 15, 961–973.
- ASHKENAZI A., DIXIT V. M., 1998. *Death receptors: signaling and modulation*. Science 281, 1305–1308.
- BARCIKOWSKA M., 1998. *Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego*. Post. Biol. Kom. 25 (Suppl.), 5–14.
- BARTUS R. T., ELLIOTT P. J., HAYWARD N. J., DEAN R. L., HARBESON S., STRAUB J. A., LI Z., POWERS J. C., 1995. *Calpain as a novel target for treating acute neurodegenerative disorders*. Neurol. Res. 17, 249–258.
- BONFOCO E., ANKARCRONA M., NICOTERA P., LIPTON S. A., 1995. *Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 162–167.
- BRICE A., 1998. *Unstable mutations and neurodegenerative disorders*. J. Neurol. 245, 505–510.
- CHARRIAUT-MARLANQUE C., AGGOUN-ZOUAOU D., REPRESA A., BEN-ARI Y., 1996. *Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp120 toxicity*. Trends Neurosci. 19, 109–114.
- DALCANTO M. C., GURNEY M. E., 1994. *Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis*. Am. J. Pathol. 145, 1271–1279.
- DAVALOS A., CASTILLO J., SERENA J., NOYA M., 1997. *Duration of glutamate release after acute ischemic stroke*. Stroke 28, 708–710.
- DRAGUNOW M., PRESTON K., 1995. *The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death*. Brain Res. Rev. 21, 1–28.
- DRAGUNOW M., YOUNG D., HUGHESW D., MacGibbon G., LAWLOR P., SINGLETON K., SIRIMANNE E., BEILHARZ E., GLUCAN P., 1993. *Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischemic brain injury?* Mol. Brain Res. 18, 347–52.
- ELDADAH B. A., YACOVLEV A. G., FADEN A. I., 1997. *The role of CED-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells*. J. Neurosci. 17, 6105–6113.
- ELLERBY H. M., MARTIN S. J., ELLERBY L. M., NAIEM S. S., RABIZADEH S., SALVESEN G. S., CASIANO C. A., CASHMAN N. R., GREEN D. R., BREDESEN D. E., 1997. *Establishment of a cell-free system of neuronal apoptosis: comparison of premitochondrial, mitochondrial, and postmitochondrial phases*. J. Neurosci. 17, 6165–6178.
- ESTUS S., ZAKS W. J., FREEMAN R. S., GRUDA M., BRAVO R., JOHNSON E. M., 1994. *Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis*. J. Biol. Chem. 269, 1717–1727.
- FILIPKOWSKI R. K., HETMAN M., KAMIŃSKA B., KACZMAREK L., 1994. *DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate*. NeuroReport 5, 1538–1540.
- FRIEDMAN A., 1993. *Choroba Parkinsona — fakty, opinie, hipotezy*. Kosmos 42, 487–494.
- GREEN D. R., REED J. C., 1998. *Mitochondria and apoptosis*. Science 281, 1309–1311.
- GURNEY M. E., 1994. *Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. N. Engl. J. Med. 331, 1721–1722.
- HAM J., BABIJ C., WHITFIELD J., PFARR C. M., LALLEMAND D., YANIV M., RUBIN L. L., 1995. *A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death*. Neuron 14, 927–39.

- HARDY J., GWINN-HARDY K., 1998. *Genetic classification of primary neurodegenerative disease*. *Science* 282, 1075–1079.
- HERDEGEN T., CLARET F. X., KALLUNKI T., MARTIN-VILLALBA A., WINTER C., HUNTER T., KARIN M., 1998. *Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury*. *J. Neurosci.* 18, 5124–5135.
- HISAHARA S., SHOJI S., OKANO H., MIURA M., 1997. *ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by Tumor Necrosis Factor*. *J. Neurochem.* 69, 10–20.
- KAMIŃSKA B., FILIPKOWSKI R. K., ZURKOWSKA G., LASON W., PRZEWOŁOCKI R., KACZMAREK L., 1994. *Dynamic changes in composition of AP-1 transcription factor DNA binding activity in rat brain following kainate induced seizures and cell death*. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1558–1566.
- KAMIŃSKA B., MOSIENIAK G., GIERDALSKI M., KOSSUT M., KACZMAREK L., 1995. *Elevated AP-1 transcription factor DNA binding activity at the onset of functional plasticity during development of rat sensory cortical areas*. *Mol. Brain Res.* 33, 295–304.
- KAMIŃSKA B., KACZMAREK L., CHAUDHURI A., 1996. *Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in rat visual cortex*. *J. Neurosci.* 16, 3968–3978.
- KAMIŃSKA B., STAŃCZYK M., 1998. *Molekularne mechanizmy neurodegeneracji*. *Post. Biol. Kom.* 25 (Suppl.), 15–28.
- KAMIŃSKA B., PYRZYŃSKA B., 1999. *Rola kinaz MAP i indukcyjnych czynników transkrypcyjnych w regulacji proliferacji i śmierci komórek*. *Post. Hig. Med. Doświadczał.* (w druku).
- KLOCKGETHER T., EVERT B., 1998. *Genes involved in hereditary ataxias*. *Trends Neurosci.* 21, 413–418.
- KLUCK R. M., BOSSY-WETZEL E., GREEN D. R., NEUMEYER D. D., 1997. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. *Science* 275, 1132–1136.
- KOSHY B. T., ZOGHBI H. Y., 1997. *The CAG/polyglutamine tract diseases: gene products and molecular pathogenesis*. *Brain Pathol.* 7, 927–942.
- KROEMER G., 1997. *The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis*. *Nat. Med.* 3, 614–620.
- LANSBURY P. T. Jr, 1997. *Structural neurology: are seeds at the root of neuronal degeneration?* *Neuron* 19, 1151–1154.
- LEIST M., NICOTERA P., 1998. *Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology*. *Exp. Cell Res.* 239, 183–201.
- LE-NICULESCU H., BONFOCO E., KASUYA Y., CLARET F. -X., GREEN D. R., KARIN M., 1999. *Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death*. *Mol. Cell Biol.* 19, 751–763.
- LEVKAU B., HERREN B., KOYAMA H., ROSS R., RAINES E. W., 1998. *Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125 FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis*. *J. Exp. Med.* 187, 579–586.
- LI P., NIJHAWAN D., BUDIARDJO I., SRINIVASULA S. M., AHMAD M., ALNEMRI E. S., WANG X., 1997. *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. *Cell* 91, 479–489.
- LIU X., KIM C. N., YANG J., JEMMERSON R., WANG X., 1996. *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. *Cell* 86, 147–157.
- OLNEY J. W., 1969. *Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. *Science* 164, 719–721.
- OLNEY J. W., 1989. *Excitotoxicity and N-methyl-D-aspartate receptors*. *Drug Dev. Res.* 17, 299–319.
- ORTH K., CHINNAIAN A. M., GARG M., FROELICH C. J., DIXIT V. M., 1996 a. *The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A*. *J. Biol. Chem.* 271, 16443–16446.
- ORTH K., O'ROURKE K., SALVESEN G. S., DIXIT V. M., 1996 b. *Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases*. *J. Biol. Chem.* 271, 20977–20980.
- PRICE D. L., SISODIA S. S., BORCHELT D. R., 1998. *Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models*. *Science* 282, 1079–1083.
- REED J. C., 1997. *Cytochrome c: can't live with it — can't live without it*. *Cell* 91, 559–562.
- ROZENGURT E., 1995. *Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes*. *Cancer Surv.* 24, 81–96.
- RUDEL T., BOKOCH G. M., 1997. *Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2*. *Science* 276, 1571–1574.
- SCARLETT J. L., MURPHY M. P., 1997. *Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition*. *FEBS Lett.* 418, 282–286.
- SCHWARTZ L. M., MILLIGAN C. E., 1996. *Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death*. *Trends Neurosci.* 19, 555–561.
- STELLER H., 1995. *Mechanisms and genes of cellular suicide*. *Science* 267, 1445–1462.
- SUSIN S. A., LORENZO H. K., ZAMZAMI N., MARZO I., SNOW B. E., BROTHERS G. M., MANGION J., JACOTOT E., COSTANTINI P., LOEFFLER M., LARPCHE N., GOODLETT D. R., AEBERSOLD R., SIDEROVSKI D. P., PENNINGER J. M., KROEMER G., 1999. *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. *Nature* 397, 441–446.
- TANG D., KIDD V. J., 1998. *Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis*. *J. Biol. Chem.* 273, 28549–28552.
- THOMPSON C. B., 1995. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. *Science* 267, 1456–1462.
- UBEDA M., HABENER J. F., 1997. *The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis*. *J Biol Chem.* 272, 19562–19568.
- VAN DER HEIDEN M. G., CHANDEL N. S., WILLIAMSON E. K., SCHUMACKER P. T., THOMPSON C. B., 1997. *Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria*. *Cell* 91, 627–637.
- WONG P. C., BORCHELT D. R., 1995. *Motor neuron disease caused by mutations in superoxide dismutase 1*. *Curr Opin Neurol.* 8, 294–301.
- WONG P. C., ROTHSTEIN J. D., PRICE D. L., 1998. *The genetic and molecular mechanisms of motor neuron disease*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 791–799.
- YANG J., LIU X., BHALLA K., KIM C. N., IBRADO A. M., CAI J., PENG T. I., JONES D. P., WANG X., 1997. *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. *Science* 275, 1129–1132.
- ZORATTI M., SZABO I., 1995. *The mitochondrial permeability transition*. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139–176.