

ZBIGNIEW DOMIŃSKI

*Department of Biochemistry and Biophysics,
Program in Molecular Biology and Biotechnology,
University of North Carolina at Chapel Hill,
Chapel Hill, NC 27599,
USA*

e-mail: dominski@med.unc.edu

APOPTOZA: ŚMIERĆ KOMÓREK W ŻYCIU ORGANIZMÓW ZWIERZĘCYCH

DWA OBLICZA ŚMIERCI KOMÓREK

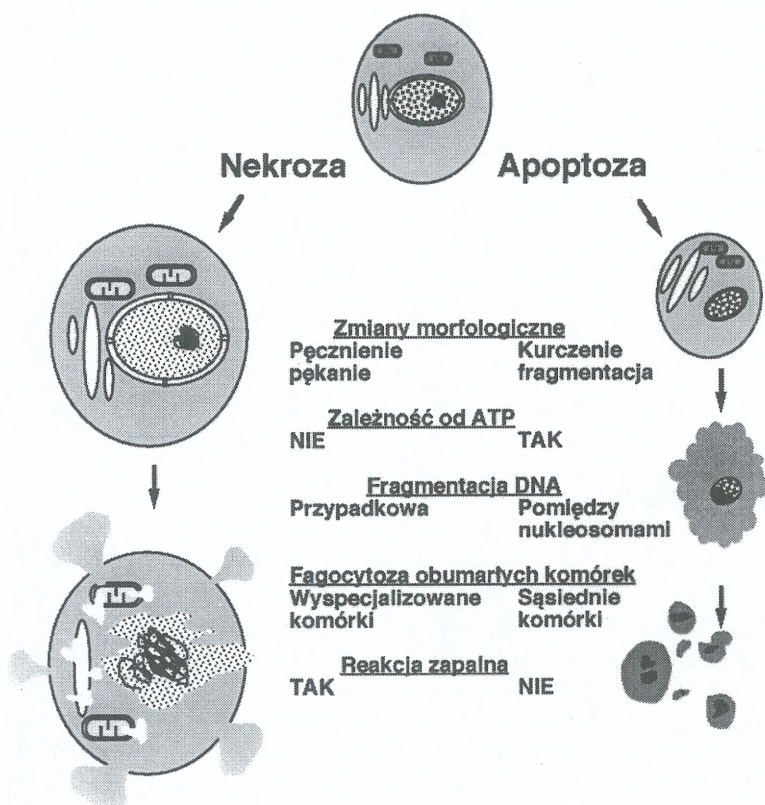
Śmierć komórek w przyrodzie może przebiegać według jednego z dwóch krańcowo odmiennych schematów: nekrozy bądź apoptozy (Ryc. 1). Nekroza zachodzi w sposób przypadkowy i niekontrolowany, zwykle w wyniku mechanicznego uszkodzenia tkanek lub działania silnych czynników stresowych, takich jak niedotlenienie, zmiany temperatury, czy ekspozycja na związki toksyczne. Na poziomie molekularnym krytycznymi wydarzeniami wyzwalającymi nekrozę jest utrata przez błonę cytoplazmatyczną zdolności do selektywnej przepuszczalności oraz gwałtowny spadek komórkowego zaopatrzenia w ATP (WYLLIE i współaut. 1980). Bezpośrednią konsekwencją tych wydarzeń jest niekontrolowane pobieranie przez uszkodzone komórki wody, zmiana wewnątrzkomórkowego składu jonowego i w dalszej kolejności, nieodwracalne uszkodzenie mitochondriów, pogłębiające deficyt energetyczny komórki. Ostatecznym aktem całkowitego załamania się homeostazy komórkowej jest pęknięcie komórek oraz wydostawanie się zawartości cytoplazmatycznej i jądrowej do przestrzeni międzykomórkowej. Fragmenty obumarłych komórek wychwytywane są przez wyspecjalizowane komórki systemu immunologicznego, których masowa migracja powoduje wystąpienie w rejonie śmierci nekrotycznej ostrej reakcji zapalnej i często wtórnego uszkodzenia przyległych tkanek. Nekroza jako wynik pasywnej degeneracji oraz przejaw patologii nie pełni w organizmach wielokomórkowych ważnych funkcji biologicznych.

Apoptoza, w przeciwieństwie do nekrozy, jest fizjologicznym procesem aktywnej samode-

strukcji, zależnym od ciągłego dopływu ATP (ARENDTS i WYLLIE 1991). Apoptoza, określana także jako zaprogramowana śmierć komórek, jest powszechnie wykorzystywana przez organizmy tkankowe do kontrolowanej eliminacji komórek na różnych etapach rozwoju osobniczego (JACOBSON i współaut. 1997). Śmierć komórek za pośrednictwem apoptozy stanowi podstawę morfogenezy umożliwiając zanik bezużytecznych organów i tkanek oraz kształtowanie części ciała, na przykład dłoni, poprzez obumieranie tkanki wypełniającej przestrzeń pomiędzy palcami. Apoptoza pełni kluczową rolę w rozwoju układu nerwowego powodując eliminację około 85% komórek nerwowych, które nie wytworzyły funkcjonalnych połączeń z innymi komórkami. Apoptozie ulega około 95% tymocytów pozbawionych prawidłowo ukształtowanych receptorów antygenowych. U prostszych organizmów zwierzęcych apoptoza jest kluczowym elementem metamorfozy, kontrolując przekształcanie larwy w owada czy kijanki w żabę. Apoptoza pełni również istotną rolę po zakończeniu procesów rozwojowych, umożliwiając wymianę komórek we wszystkich niemal tkankach i precyzyjną regulację ich liczby zgodnie z bieżącymi potrzebami dojrzałego organizmu. Apoptoza jest odpowiedzialna za uwarunkowane hormonalnie zanikanie nabłonka macicy, gruczołów mlecznych, prostaty, grasicy oraz innych narządów i tkanek. Szacuje się, że w dojrzałym organizmie człowieka w efekcie nieprzerwanego procesu odnowy tkankowej, codziennie eliminacji ulega niewiarygodna liczba 10^{11} komórek. Apoptoza pełni wreszcie bardzo ważną funkcję ochronną, prowadzi bowiem

do usuwania powstających w trakcie życia organizmu szkodliwych komórek, takich jak komórki nowotworowe czy komórki zainfekowane wirusami.

domeną organizmów wielokomórkowych (AMEISEN 1996). Pewne formy śmierci komórkowej, przypominające w przebiegu apoptozę organizmów tkankowych wykryto ostatnio w niektó-



Ryc. 1. Schematyczny przebieg oraz podstawowe cechy odróżniające dwa mechanizmy śmierci komórek w przyrodzie: nekrozy (lewa strona) i apoptozy (prawa strona).

Wykształcenie mechanizmu apoptycznej śmierci komórkowej stanowiło zapewne jedną z podstawowych i wczesnych zdobyczy ewolucyjnych, umożliwiających powstanie i stopniową komplikację budowy organizmów wielokomórkowych. Apoptoza występuje prawdopodobnie we wszystkich organizmach zwierzęcych, jej obecność wykryto między innymi u hydry. Zjawisko apoptozy, choć nie na taką skalę, stwierdzono także w organizmach roślinnych. Wbrew wcześniejszym przypuszczeniom zaprogramowana śmierć komórkowa nie jest wyłączną

rych jednokomórkowych organizmach eukariotycznych, na przykład w orzęsku *Tetrahymena thermophila*. Istnienie kontrolowanej śmierci komórkowej w tych organizmach może stanowić cenny mechanizm pozwalający na redukcję liczebności kolonii w warunkach ograniczonego dostępu środków pokarmowych. Prymitywne formy kontrolowanej śmierci w organizmach jednokomórkowych są prawdopodobnie ewolucyjnym zaczątkiem apoptozy w wyższych organizmach zwierzęcych.

PRZEBIEG I LOGIKA APOPTOZY

Apoptoza z punktu widzenia morfologicznego jest przeciwieństwem nekrozy i zachodzi w wyniku kurczenia i fragmentacji komórek, nie zaś ich pęcznienia i pękania (ARENDTS i WYLLIE 1991) (Ryc. 1). Pierwszym, łatwo dostrzegalnym etapem apoptozy jest kondensacja jądra komórkowego i agregacja chromatyny na jednym z biegunów błony jądrowej. Stopniowej kondensacji ulega także cytoplazma, a gładka zazwyczaj błona komórkowa przybiera nieregularną, pofałdowaną strukturę. Skurczone jądro rozpada się ostatecznie na wiele części, podczas gdy

wypukłości cytoplazmatyczne odrywają się od powierzchni komórki przyjmując postać tak zwanych ciałek apoptycznych. Ciała apoptyczne, zawierające często całe mitochondria i fragmenty jądra komórkowego, dostają się do przestrzeni międzykomórkowej, gdzie ulegają natychmiastowej fagocytozie przez sąsiednie komórki. Apoptyczne obumieranie komórek nie powoduje migracji wyspecjalizowanych komórek układu odpornościowego i zachodzi bez wywoływania stanu zapalnego.

Charakterystycznym zmianom morfologicznym w komórkach przechodzących apoptozę towarzyszy szereg zmian biochemicznych. Jedną z takich zmian jest aktywacja transglutaminazy, enzymu katalizującego powstawanie w białkach błony cytoplazmatycznej wiązań pomiędzy lizyną i glutaminą. Dzięki aktywności tego enzymu błona cytoplazmatyczna komórek przechodzących apoptozę przypomina zwartą skorupę białkową, nierozpuszczalną w silnych detergentach. Błona cytoplazmatyczna jest równocześnie miejscem szeregu innych, słabo poznanych modyfikacji biochemicznych, umożliwiających rozpoznanie i natychmiastową fagocytozę ciałek apoptycznych przez sąsiednie komórki. Procesem uważanym za wizytówkę apoptozy i często stosowanym dla odróżnienia tego typu śmierci komórkowej od nekrozy, jest fragmentacja chromosomalnego DNA w przestrzeniach pomiędzy nukleosomami. W efekcie, DNA izolowany z komórek ulegających apoptozie składa się z fragmentów o wielokrotności około 200 nukleotydów.

Wszystkie zmiany morfologiczne i biochemiczne zachodzące podczas apoptozy mają głęboki sens biologiczny i sprawiają, że utrata znacznych części organów czy tkanek nie powoduje szkodliwych konsekwencji dla organizmu. Dla prawidłowego przebiegu apoptozy kluczowe znaczenie ma jak najdłuższe utrzymanie w obumierającej komórce podstawowych procesów metabolicznych i nieprzerwanego dopływu energii. Właściwości tych nie tracą także ciała apoptyczne, których błona cytoplazmatyczna zachowuje zdolność nie tylko do selektywnej przepuszczalności, lecz także do fagocytozy innych, mniejszych ciałek apoptycznych. Ograniczona aktywność metaboliczna, wsparta funkcją transglutaminazy, skutecznie zapobiega pęcznieniu i pękaniu ciałek apoptycznych i w konsekwencji, wydostawaniu się ich zawartości do przestrzeni międzykomórkowej. Zachowanie integralności zewnętrznej błony komórkowej przez ciała apoptyczne ma dodatkowe znaczenie w przypadku apoptozy indukowanej przez infekcję wirusową, bowiem uniemożliwia wydostanie się uformowanych wirionów do przestrzeni międzykomórkowej i ich dalsze rozprzestrzenianie. Nie bez znaczenia jest także fragmentacja wewnątrzkomórkowego DNA, której efektem jest inaktywacja genomu wirusowego. Kondensacja cytoplazmy i jądra komórkowego oraz powstawanie ciałek apoptycznych służy zapewne ich łatwej konsumpcji przez sąsiednie komórki tkanki, które w przeciwieństwie do wyspecjalizowanych komórek żernych układu immunologicznego posiadają jedynie ograni-

czoną zdolność do fagocytozy. Przechwytywanie i metabolizm ciałek apoptycznych przez sąsiednie komórki sprawia, że apoptoza jest procesem nadzwyczaj ekonomicznym. Przemiana poczwarki w dojrzałą postać owada dokonuje się przy niemal całkowitej izolacji od środowiska zewnętrznego, tylko w oparciu o energię zgazynowaną w eliminowanych komórkach poczwarki.

Apoptoza, ze względu na szybkie tempo zmian morfologicznych i brak reakcji zapalnej, pomimo powszechnego charakteru, przez wiele lat umykała uwadze histologów i przedstawicieli innych dyscyplin naukowych. Występowanie w organizmie człowieka innego niż nekroza typu śmierci komórkowej opisane zostało po raz pierwszy w 1971 roku, w artykule „Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death” (KERR 1971). Bardziej szczegółowy przebieg tego typu śmierci komórek przedstawiony został rok później w artykule „Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics” (KERR i współaut. 1972). Wprowadzony wówczas do literatury termin „apoptoza” (apoptosis) oznacza w grece opadanie liści z drzew lub płatków z kwiatów i nawiązuje do biologicznie zaprogramowanej, cyklicznie zachodzącej śmierci. Potencjalne znaczenie apoptozy w przyrodzie nie od razu dotarło do świadomości środowiska naukowego. Obie, historyczne już prace na temat apoptozy, przeminęły właściwie niezauważone, nie wpływając w większym stopniu na zmianę dominującego wówczas poglądu o patologicznym i degeneracyjnym charakterze śmierci komórkowej. Jeszcze pod koniec lat 80-tych Amerykańskie Towarzystwo do Badań nad Rakiem odrzuciło propozycję zorganizowania specjalnego spotkania na temat apoptozy w obawie przed niedostateczną liczbą uczestników. Niedługo potem apoptoza urosła do rangi jednego z najważniejszych i jednocześnie najatrakcyjniejszych tematów badawczych w naukach bio-medycznych. Do szybkiego wzrostu zainteresowania apoptozą przyczyniły się między innymi obserwacje wskazujące na jej rolę w etiologii szeregu chorób człowieka. O skali tego zainteresowania najlepiej świadczy liczba około 20 tysięcy publikacji dotyczących różnych aspektów apoptozy, które ukazały się w ciągu ostatnich 5 lat w czasopiśmie naukowych na świecie. Rezultatem współczesnej fascynacji apoptozą jest szereg spektakularnych odkryć, które przybliżyły zrozumienie tego procesu na poziomie molekularnym i uświadomiły fundamentalne znaczenie śmierci komórek w życiu wyższych organizmów zwierzęcych.

GENETYCZNA KONTROLA APOPTOZY

Śmierć komórek z oczywistych względów musi się znajdować pod bardzo ścisłą i wielostronną kontrolą genetyczną. Kluczem do poznania mechanizmów kontrolujących apoptozę stały się badania nad niewielkim nicieniem z gatunku *Caenorhabditis elegans* (ELLIS i współaut. 1991). Spośród 1090 komórek somatycznych tego organizmu, 131 ulega precyzyjnie zaprogramowanej eliminacji za pośrednictwem apoptozy. Śmierć komórek w trakcie rozwoju osobniczego *C. elegans* jest uzależniona od aktywności dwóch genów, *ced-3* i *ced-4* (ang. cell death). Mutacje w którymkolwiek z tych genów blokują apoptozę i umożliwiają przeżycie większości z przeznaczonych do eliminacji komórek. Paradoksalnie, ocalone w ten sposób komórki są zdolne do częściowego różnicowania i wypełniania ograniczonych funkcji w dojrzałych osobnikach *C. elegans*. Mutanty *C. elegans*, pomimo nieco większej masy, nie odbiegają pod względem zachowania i wyglądu od osobników typu dzikiego, prowokując pytanie o ewolucyjny sens zaprogramowanej śmierci komórkowej w tym organizmie. Ekspresja genów *ced-3* i *ced-4*, określanych czasami jako geny śmierci, nie jest ograniczona jedynie do komórek eliminowanych za pomocą apoptozy i zachodzi we wszystkich komórkach nicienia. Komórki wchodzące w skład dojrzałych osobników unikają apoptozy dzięki aktywności genu *ced-9*, który jest negatywnym regulatorem genów śmierci *ced-3* i *ced-4*. Ochronnego efektu "genu życia" *ced-9* pozbawione są jedynie komórki przechodzące apoptozę, w których gen ten nie ulega ekspresji. Mutacje inaktywujące gen *ced-9* są letalne, bowiem powodują śmierć wszystkich komórek organizmu na etapie embrionalnym.

CED-9 I RODZINA BIAŁEK BCL-2

Pod względem funkcjonalnym gen *ced-9* wykazywał szereg wspólnych cech ze ssaczym onkogenem *bcl-2*, którego silna nadekspresja jest odpowiedzialna za powstawanie niektórych chłoniaków komórek B (ang. B-cell lymphomas) (HENGARTNER i HORVITZ 1994). Gen *bcl-2* jest nietypowym onkogenem; w przeciwieństwie do wielu innych onkogenów, jego udział w procesie transformacji nowotworowej nie polega na stymulacji podziałów komórkowych, lecz na podnoszeniu oporności komórek nowotworowych na czynniki zewnętrzne normalnie wywołujące apoptozę. Najbardziej uderzającym potwierdze-

niem podobieństwa funkcjonalnego obu genów była obserwacja, że nadekspresja ludzkiego genu *bcl-2* może częściowo powstrzymać apoptozę komórek *C. elegans* zawierających mutację w genie *ced-9*. Zdolność genu ssaczego do wypełniania podobnych funkcji w komórkach organizmu bezkręgowego wskazuje na zadziwiającą niezmienną ewolucyjną apoptyczną śmierci komórkowej. Podobieństwo funkcjonalne pomiędzy genami *ced-9* i *bcl-2* znajduje potwierdzenie na poziomie strukturalnym: białka Ced-9 i Bcl-2 wykazują ogólne podobieństwo sekwencji aminokwasowych oraz zawierają kilka tak zwanych regionów BH (ang. bcl-2 homology) o szczególnie silnej tendencji do stałości ewolucyjnej.

Myszy pozbawione funkcjonalnego genu *bcl-2* charakteryzują się zaskakująco normalnym rozwojem i fenotypem (jedynymi łatwo dostrzegalnymi cechami zewnętrznymi są nieco zmniejszone uszy i wcześniej siwiejąca sierść), jednak umierają na stosunkowo wczesnym etapie życia na skutek apoptycznej śmierci komórek limfoidalnych. Obserwacje te wskazywały na tkankowo-specyficzny charakter genu *bcl-2* i nasuwały przypuszczenie, że inne geny pełnią analogiczną funkcję w pozostałych tkankach organizmu. Rzeczywiście, w stosunkowo krótkim czasie w komórkach ssaków zidentyfikowano drugi gen anty-apoptyczny, *bcl-xL*, który reguluje apoptozę w komórkach nerwowych. Myszy pozbawione aktywnego genu *bcl-xL* umierają na etapie embrionalnym na skutek masowej apoptozy neuronów centralnego układu nerwowego. Obecność w organizmach ssaków większej niż w przypadku *C. elegans* liczby genów anty-apoptycznych jest zapewne odzwierciedleniem bardziej skomplikowanej budowy i złożoności procesów rozwojowych tych organizmów. Oprócz białek anty-apoptycznych, w komórkach ssaków wykryto liczną grupę białek strukturalnie zbliżonych do Bcl-2 i Bcl-xL, jednak wykazujących przeciwstawne, pro-apoptyczne właściwości, na przykład Bax, Bcl-xS i Bad. Wspólnie białka te tworzą jedną, szybko powiększającą się rodzinę Bcl-2/Ced-9 (REED 1998). Cechą charakterystyczną białek rodziny Bcl-2/Ced-9 jest zdolność do wzajemnego oddziaływania i tworzenia homo- i heterodimerów. Przyjmuje się, że tworzenie dimerów składających się z obu białek pro-apoptycznych rodziny Bcl-2 prowadzi do apoptozy, podczas gdy tworzenie dimerów składających się z białek anty-apoptycznych nadaje komórkom oporność na

apoptozę. Heterodimeryzacja pro- i anty-apoptycznych przedstawicieli rodziny hamuje biologiczną aktywność każdego z partnerów. Podatność komórek na apoptozę jest zatem uzależniona od wzajemnego stosunku ilościowego białek pro- i anty-apoptycznych i w konsekwencji, komórkowego stężenia aktywnych homodimerów zawierających białka o tym samym charakterze. Istotną właściwością niemal wszystkich białek z rodziny Bcl-2/Ced-9 jest obecność na końcu karboksylowym tak zwanej domeny transmembranowej, składającej się z szeregu aminokwasów hydrofobowych. Domena ta jest odpowiedzialna za lokalizację białek rodziny Bcl-2/Ced-9 w obrębie błon wewnątrzkomórkowych, głównie w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej. Amino-końcowa część tych białek jest skierowana do cytozolu, gdzie uczestniczy w dodatkowych oddziaływaniach, modyfikujących ich właściwości biologiczne. Pomimo intensywnych badań biochemiczna funkcja białek z rodziny Bcl-2 jest słabo rozumiana i pozostaje jedynie przedmiotem licznych spekulacji. Rozszyfrowanie mechanizmu działania tych białek na poziomie molekularnym, ze względu na ich różnorodność, jak i nietypową lokalizację w obrębie błon wewnątrzkomórkowych, stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej biologii molekularnej.

CED-3 I ŚMIERCIONOŚNE KASPAZY

Gdy w 1993 roku sklonowano *ced-3*, jeden z dwóch genów śmierci z *C. elegans*, stwierdzono, że sekwencja aminokwasowa białka kodowanego przez ten gen wykazuje podobieństwo do specyficznej proteazy ludzkiej, tak zwanej ICE (ang. interleukin-1 β converting enzyme) (YUAN i współaut. 1993). Proteaza ICE jest odpowiedzialna za przekształcenie nieaktywnego prekursora interleukiny-1 β (IL-1 β) w formę biologicznie aktywną, uczestniczącą w wywoływaniu stanów zapalnych. Aktywacja IL-1 β przez ICE polega na wprowadzeniu pojedynczego proteolitycznego cięcia bezpośrednio za asparaginą w pozycji 116 pro-interleukiny. ICE należy do unikalnej grupy proteaz komórkowych wykorzystujących w procesie katalitycznym jedną ze swych reszt cysteinowych. Stwierdzenie podobieństwa pomiędzy białkami Ced-3 i ICE wskazywało na centralną rolę proteaz cysteinowych w procesie apoptycznej śmierci komórek i spowodowało intensywne poszukiwania innych enzymów o zbliżonych właściwościach biochemicznych. W krótkim czasie z komórek ssaków wyizolowano kilkanaście białek wykazujących silne podobieństwo strukturalne do Ced-3 i ICE. Białka te tworzą wspólną rodzinę proteaz,

których cechą charakterystyczną jest udział reszty cysteinowej w procesie katalitycznym i trawienie białek bezpośrednio za asparaginą (NICHOLSON i THORNBERRY 1997). Dla podkreślenia obu unikalnych właściwości biochemicznych, proteazy te określa się jako kaspazy (ang. caspases, cysteine aspartate-specific proteases).

Kaspazy są heterodimerami, składającymi się z dwóch podjednostek o różnej masie cząsteczkowej (NICHOLSON i THORNBERRY 1997). Choć reszta cysteinowa pełniąc kluczową rolę w katalizie znajduje się w obrębie większej podjednostki kaspazy, mniejsza podjednostka, jako nośnik kilku aminokwasów wchodzących w skład centrum aktywnego, jest niezbędna do uformowania proteolitycznie aktywnego białka. Kaspazy, podobnie jak inne proteazy komórkowe, syntetyzowane są jako nieaktywne prekursor (zymogeny). Prekursory kaspaz są zorganizowane według podobnego planu budowy i składają się z N-końcowej prodomeny o różnej długości oraz dwóch podjednostek rozdzielonych centralną domeną regulatorową. Dojrzwienie i aktywacja kaspaz polega na proteolitycznym odcięciu prodomeny oraz centralnej domeny regulatorowej i uwolnieniu obu podjednostek. Miejsca, w których dochodzi do proteolitycznego trawienia pro-kaspaz znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie asparagin sugerując, że w procesie aktywacji uczestniczą same kaspazy lub inne proteazy o podobnej specyfice substratowej.

Nie wszystkie kaspazy są związane z apoptozą. Oprócz ICE, obecnie określanej jako kaspaza 1, co najmniej dwie inne kaspazy biorą udział w aktywacji cytokin i funkcjonowaniu układu odpornościowego. Zmodyfikowane genetycznie myszy pozbawione aktywności kaspazy 1 nie wykazują żadnych dostrzegalnych zmian w przebiegu apoptozy i defektów rozwojowych. Zgodnie z rolą kaspazy 1 w procesach immunologicznych, mutanty te charakteryzują się ograniczoną zdolnością do indukowania reakcji zapalnej. Spośród wyizolowanych do tej pory kilkunastu ssaczych kaspaz apoptycznych, bardzo zbliżona do Ced-3 jest kaspaza 3, wcześniej znana pod nazwą CPP 32. Oba białka wykazują około 35% identyczności i 60% podobieństwa sekwencji aminokwasowych, a także posiadają silnie konserwowany we wszystkich kaspazach pięcio-aminokwasowy region zawierający katalityczną cysteinę. W przeciwieństwie do ICE, kaspaza 3 jest niezbędna do rozwoju organizmu. Delecja genu kodującego tę proteazę z genomu myszy powoduje masową akumulację komórek nerwowych w mózgu i w efekcie śmierć mutantów na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Ta drastyczna redukcja apo-

ptozy w zmutowanych myszach stanowiła jeden z pierwszych i najbardziej dobitnych dowodów na udział kaspaz w procesie apoptycznej śmierci komórkowej. Podobnie jak w przypadku mutacji w genie *bcl-2*, uderzający jest selektywny charakter mutacji w genie kodującym kaspazę 3 i brak wyraźnych zmian w innych tkankach i organach. Specyficzność tkankowa jest prawdopodobnie jednym z powodów tłumaczących występowanie w wyższych organizmach zwierzęcych wielu odrębnych kaspaz. Mnogość i różnorodność kaspaz znajduje ponadto wytłumaczenie w ich selektywności substratowej. Poszczególne kaspazy, chociaż przecinają białka zawsze bezpośrednio za asparaginą, rozpoznają dodatkowo trzy aminokwasy poprzedzające asparaginę od strony aminowej. Sekwencja wszystkich trzech aminokwasów, a w szczególności charakter biochemiczny pierwszego z nich, jest głównym wyznacznikiem specyficzności tej klasy proteaz. Ze względu na stosunkowo niskie prawdopodobieństwo wystąpienia określonych sekwencji aminokwasowych w bezpośrednim sąsiedztwie asparaginy, poszczególne kaspazy rozpoznają jedynie niewielką liczbę białek, wprowadzając w ich obrębie jedno, rzadziej dwa proteolityczne cięcia. W efekcie, proteoliza za pośrednictwem kaspaz nie prowadzi do całkowitej hydrolizy białek, charakterystycznej dla mniej specyficznych proteaz.

W ostatnich latach zidentyfikowano kilkadziesiąt substratów białkowych ulegających proteolitycznej fragmentacji za pośrednictwem kaspaz w trakcie apoptycznej śmierci komórkowej (CRYNS i YUAN 1998). Pierwszym zidentyfikowanym substratem kaspazy 3 była polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP), białko jądrowe uczestniczące w naprawie DNA i utrzymywaniu integralności genomu. Enzym ten ulega aktywacji w obecności uszkodzonego i jednoniciowego DNA prowadząc między innymi do modyfikacji enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Aktywacja PARP na skutek zachodzącej masowo w czasie apoptozy degradacji DNA prowadzić mogłaby do szybkiego obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, utrudniając tym samym prawidłowy przebieg apoptozy, zależnej od ciągłego dopływu energii. W czasie apoptozy proteolitycznej inaktywacji ulegają także inne enzymy związane z naprawą i replikacją DNA, a także kluczowe białka związane z innymi podstawowymi procesami komórkowymi, jak transkrypcja, składanie RNA, translacja i regulacja cyklu komórkowego. Oprócz białek enzymatycznych, substratami kaspaz są także białka strukturalne, których proteolityczna fragmentacja jest przyczyną charakterystycznych zmian morfologicznych w czasie apoptozy.

Fragmentacja lamin, przylegających do błony jądrowej i stanowiących wyściółkę do której przymocowany jest DNA, powoduje na przykład tak typowe dla apoptozy zjawiska, jak biegunkowa dystrybucja chromatyny i rozpad jądra komórkowego. Ekspresja w komórkach zmodyfikowanych lamin, opornych na działanie kaspaz, całkowicie zapobiega tym zmianom lub opóźnia moment ich wystąpienia w czasie śmierci apoptycznej. Ograniczona proteolityczna fragmentacja aktyny i innych białek cytoskieletu prowadzi do kondensacji cytoplazmy, utraty kontaktu z sąsiednimi komórkami i rozpadu na ciała apoptyczne. Zależna od kaspaz proteoliza ma selektywny charakter i obejmuje tylko ograniczoną grupę białek komórkowych. Fragmentacja tych białek zachodzi według ściśle określonego scenariusza, prowadząc do systematycznego i uporządkowanego demontażu poszczególnych struktur komórkowych i inaktywacji podstawowych procesów metabolicznych. Proteolityczna fragmentacja niewielkiej grupy białek nie wiąże się prawdopodobnie z żadnymi funkcjami biologicznymi i zachodzi na zasadzie przypadkowości.

Obok białek ulegających inaktywacji w czasie apoptozy, w komórkach ssaków zidentyfikowano grupę białek, które w wyniku ograniczonej proteolizy za pośrednictwem kaspaz ulegają aktywacji bądź funkcjonalnej modyfikacji (CRYNS i YUAN 1998). Do grupy tej należą na przykład niektóre kinazy, które po odcięciu fragmentu białka przechodzą w stan konstytutywnej aktywacji i są odpowiedzialne między innymi za biochemiczną modyfikację błon komórkowych, niezbędną w procesie wchłaniania ciałek apoptycznych przez otaczające komórki. Do białek komórkowych, których aktywność ulega modyfikacji na skutek proteolitycznej fragmentacji należą także anty-apoptyczne białka z rodziny Bcl-2. Białka te w wyniku precyzyjnego trawienia proteolitycznego przez jedną z kaspaz, ulegają przekształceniu do białek o przeciwnym, pro-apoptycznym charakterze, dodatkowo przyspieszając, zamiast hamować, śmierć komórkową. Istnienie tego typu samonakręcającej się śmiercionośnej spirali jest zjawiskiem powszechnym w przebiegu apoptozy i stanowi przykład logiki tego procesu, w którym raz zainicjowany mechanizm prowadzi do szybkiej i nieodwracalnej dezintegracji komórki.

Jednym z ciekawszych białek, ulegających aktywacji w obecności kaspaz jest nukleaza odpowiedzialna za demontaż największej i najważniejszej struktury komórkowej, chromatyny (WYLLIE 1998). Rozpad chromatyny na małe fragmenty, składające się z różnej liczby nu-

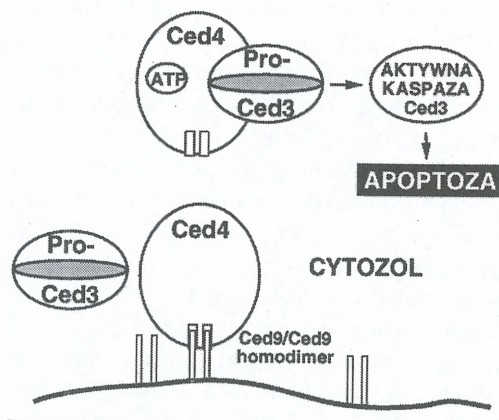
kleosomów, zaobserwowany został stosunkowo wcześniej w badaniach nad apoptozą i od tego czasu służył jako cecha odróżniająca ten typ śmierci komórkowej od nekrozy, w trakcie której dochodzi do całkowitej degradacji DNA przez nukleazy uwolnione z rozpadających się lizosomów. Próba identyfikacji nukleazy odpowiedzialnej za przecinanie DNA między nukleosomami przez wiele lat stanowiła standardowe i priorytetowe przedsięwzięcie w badaniach nad apoptozę. Poszukiwaniom nukleazy apoptycznej towarzyszyła niewzruszona wówczas wiara w centralną i sprawczą rolę fragmentacji DNA w indukcji śmierci komórek. Nukleaza odpowiedzialna za apoptyczną fragmentację DNA została wyizolowana dopiero w 1998, to jest ponad 20 lat po odkryciu tego zjawiska przez grupę radiologów w tymocytach naświetlanych promieniami jonizującymi. Nukleaza ta, określona jako CAD (ang. caspase-activated deoxyribonuclease), jest obecna w cytozolu wszystkich analizowanych komórek w formie nieaktywnej, w kompleksie z podjednostką inhibitorową. Aktywacja kaspaz w trakcie apoptozy prowadzi do proteolizy inhibitora i przemieszczenia aktywnej nukleazy do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy we fragmentacji DNA. Nadekspresja podjednostki inhibitorowej odpornej na proteolizę umożliwia zablokowanie fragmentacji DNA lecz nie wpływa na inne typowe dla apoptozy zmiany biochemiczne i morfologiczne.

Jedną z podstawowych funkcji kaspaz jest aktywacja innych kaspaz. W trakcie apoptozy dochodzi do kaskady proteolitycznej, w wyniku której aktywacja jednej kaspazy umożliwia obróbkę i aktywację innych cząsteczek tego samego typu oraz kaspaz o odmiennej specyfice substratowej. Kaskada proteaz, mająca kluczowe znaczenie w procesie krzepnięcia krwi i aktywacji dopełniacza, w przypadku kaspaz może prowadzić do odpowiedniego wzmocnienia sygnału, gwarantującego szybki i nieodwracalny przebieg apoptozy.

CED-4 I AKTYWACJA KASPAZ

O ile obróbka prekursorów kaspaz przez już aktywne kaspazy jest łatwa do zrozumienia, problemem pozostawała aktywacja pierwszej kaspazy, inicjującej proces kaskadowy. Szczegółowa analiza aktywacji kaspazy Ced-3 w *C. elegans* wykazała, że rola ta przypada białku kodowanemu przez drugi gen śmierci tego organizmu, Ced-4. Funkcja białka Ced-4, zlokalizowanego w obrębie cytozolu komórkowego, polega na stymulowaniu w obecności źródła energii autokatalitycznej aktywacji Ced-3 (HENGART-

NER 1997). Prekursor Ced-3, po utworzeniu kompleksu z Ced-4 i ATP, przechodzi zmiany konformacyjne, które umożliwiają wycięcie jego własnej domeny regulatorowej i utworzenie aktywnego enzymu, inicjującego kaskadę proteolityczną. Białko Ced-4 posiada także zdolność do oddziaływania z anty-apoptycznym białkiem Ced-9, występującym w komórkach. Przyjmuje się, że tworzenie kompleksu pomiędzy tymi białkami prowadzi do przemieszczenia Ced-4 z cytozolu do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie zlokalizowany jest Ced-9, zapobiegając tym samym aktywacji znajdującej się w cytozolu pro-kaspazy Ced-3. W podsumowaniu, dotychczasowe badania nad apoptozą u *C. elegans* wykazały stosunkowo prostą organizację aparatu śmierci komórkowej w tym organizmie: aktywność pojedynczej kaspazy Ced-3, bezpośrednio odpowiedzialnej za śmierć komórkową, jest precyzyjnie regulowana przez jeden aktywator (Ced-4) i jeden inhibitor (Ced-9) (Ryc. 2).



Ryc. 2. Samoaktywacja pro-kaspazy Ced-3 za pośrednictwem białka adaptorowego Ced-4 i ATP.

Białko Ced-9 związane z zewnętrzną błoną mitochondrialną i obecne w komórkach *C. elegans* nie przechodzących apoptozy, zapobiega przekształceniu Ced-3 w aktywną kaspazę poprzez usuwanie Ced-4 z cytozolu i niedopuszczanie do tworzenia kompleksu aktywacyjnego.

Bardziej skomplikowany przebieg ma aktywacja kaspaz w komórkach ssaczy. Homologiem Ced-4 jest w komórkach organizmów wyższych czynnik cytozolowy, określany jako Apaf-1 (ang. apoptosis activating factor 1). Białko to, wyizolowane w 1998, jest obecne we wszystkich analizowanych typach komórek, wykazując szczególnie wysoką ekspresję w tkankach i narządach o intensywnej apoptozie, takich jak śledziona, obwodowe leukocyty oraz embrionalny mózg i płuca. Apaf-1 umożliwia

dojrzewanie jednej z pro-kaspaz ssaczych, pro-kaspazy 9, i jej przekształcenie w aktywną kaspazę 9 (HENGARTNER 1997). W przeciwieństwie do mechanizmu aktywacji Ced-3 w *C. elegans*, aktywacja kaspazy 9 przez Apaf-1, oprócz źródła energii, wymaga dodatkowego czynnika cytoplazmatycznego, którego identyfikacja stanowiła jedną z większych niespodzianek biochemicznych ostatnich lat. Czynnikiem tym okazał się cytochrom c, którego powszechnie znaną funkcją jest udział w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym i syntezie ATP. Cytochrom c jest syntetyzowany przez cytoplazmatyczne rybosomy jako apocytochrom c, po czym ulega translokacji do mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, gdzie po przyłączeniu grupy hemowej, tworzy aktywny cytochrom c (holocytochrom c). Ekstrakty cytoplazmatyczne pozbawione cytochromu c tracą zdolność do aktywowania kaspaz, którą w pełni odzyskują po dodaniu komercyjnie dostępnego (a więc biochemicznie czystego) holocytochromu c, lecz nie apocytochromu c. Bliższa analiza mikroskopowa mitochondriów wykazała, że uwalnianie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu stanowi jedną z wcześniejszych zmian w komórkach poddanych bodźcom pro-apoptycznym (REED 1997). Inaktywacja łańcucha oddechowego mitochondriów na skutek utraty cytochromu c początkowo wydawała się przeczyć kluczowej roli ATP w apoptozie. Obecnie przyjmuje się, że uwalnianie cytochromu c do cytozolu zachodzi stopniowo i nie wyklucza dostaw niezbędnej energii, koniecznej do zakończenia procesu dezintegracji komórki.

Bliska lokalizacja pro- i antyapoptycznych białek z rodziny Bcl-2 oraz cytochromu c w obrębie błon mitochondrialnych nie wydaje się być dziełem przypadku. Pro-apoptyczne białka rodziny ułatwiają wydostawanie się cytochromu c do cytozolu, podczas gdy białka o właściwościach anty-apoptycznych, na przykład Bcl-2, wywołują przeciwny efekt, zatrzymując cytochrom c w przestrzeni międzybłonowej (REED 1998). Udział białek z grupy Bcl-2 w regulacji uwalniania cytochromu c ma prawdopodobnie związek z ich potencjalną zdolnością do tworzenia kanałów jonowych w błonach komórkowych. Na właściwości takie wskazuje struktura trójwymiarowa kilku przedstawicieli rodziny Bcl-2, przypominająca domeny niektórych toksyn bakteryjnych, na przykład dyfterytu, oraz badania przy zastosowaniu syntetycznych membran lipidowych. Przypuszcza się, że rola białek anty-apoptycznych może polegać na ograniczaniu zdolności kanałów jonowych formowanych przez białka pro-apoptyczne do

przepuszczania jonów i niewielkich białek, jak cytochrom c. Hipoteza ta nie znalazła jednak dotychczas przekonującego potwierdzenia eksperymentalnego. Alternatywna hipoteza sugeruje, że uwalnianie cytochromu c do cytozolu związane jest z drastycznymi zmianami w potencjale elektro-chemicznym błon mitochondrialnych. Bezpośrednim efektem tych zmian mogłoby być pęczniecie mitochondriów i pęknięcie zewnętrznej błony prowadzące do uwolnienia cytochromu c. Niewątpliwie, ostatnie odkrycia wskazujące na rolę białek z rodziny Bcl-2 w regulacji uwalniania cytochromu c dodatkowo skomplikowały i tak niejasny mechanizm działania tych białek w apoptozie.

Szereg badań sugeruje, że oprócz regulacji wypływu cytochromu c, białka z rodziny Bcl-2 wpływają na aktywację kaspaz poprzez bezpośrednie oddziaływanie z Apaf-1 (REED 1998). Podobnie jak w komórkach *C. elegans*, białka anty-apoptyczne mogłyby neutralizować funkcję Apaf-1 poprzez zmianę jego lokalizacji z cytozolowej na błonową. Podwójna rola białek anty-apoptycznych w hamowaniu aktywności kaspaz może stanowić skuteczny mechanizm zabezpieczający przed niepożądaną indukcją śmierci komórkowej.

Autoaktywacja kaspaz przy udziale cytochromu c i Apaf-1 nie jest jedynym mechanizmem umożliwiającym inicjację kaskady proteolitycznej. W niektórych komórkach za autoaktywację innej z kaspaz, kaspazy 11, odpowiedzialny jest odmienny w charakterze kompleks białkowy, tworzony w pobliżu błony cytoplazmatycznej i związany z receptorami powierzchniowymi, takimi jak TNFR (ang. tumor necrosis factor receptor) czy Fas (NAGATA 1997). Sygnałem prowadzącym do autoaktywacji kaspazy 11 jest związanie się receptora z jego naturalnym ligandem. W odróżnieniu od autoaktywacji kaspazy 9 za pośrednictwem Apaf-1, dojrzewanie kaspazy 11 za pośrednictwem kompleksu receptorowego jest niezależne od cytochromu c i w konsekwencji, nie jest blokowane przez anty-apoptyczne białka z rodziny Bcl-2. Receptory typu Fas są obecne w dużej ilości na powierzchni na przykład zaktywowanych limfocytów B. Kontakt receptora Fas ze specyficznym ligandem FasL obecnym na powierzchni cytotoksycznych limfocytów T jest powszechnym sposobem apoptycznej eliminacji komórek B po zakończeniu ich roli w zwalczaniu infekcji organizmu. Cytotoksyczne limfocyty T dysponują także trzecim i najprostszym mechanizmem wewnątrzkomórkowej aktywacji kaspaz, polegającym na wprowadzeniu do eliminowanych komórek granzymu B. Granzym B jest proteazą

serynową, która trawi białka bezpośrednio za asparaginą, wykazuje zatem podobną do caspaz specyfikę substratową. Enzym ten, po wprowadzeniu do komórek przez cytotoksyczne limfocyty T, umożliwia aktywację kaspaz bez konieczności wstępnej autoaktywacji.

Kaspazy, ulegające autoaktywacji w obecności takich białek regulatorowych jak Ced-4 lub Apaf-1, określane są jako kaspazy inicjatorowe. Cechą tych kaspaz, obejmujących Ced-3 oraz kaspazy 9 i 11, jest obecność w ich prekursorach długiej N-końcowej prodomeny, która stanowi fizyczny łącznik umożliwiający oddziaływanie z białkami regulatorowymi. Pozostałe kaspazy, tak zwane efektorowe, ulegają aktywacji za pośrednictwem kaspaz inicjatorowych oraz innych kaspaz efektorowych i posiadają jedynie krótkie prodomeny.

Odkrycia kilku ostatnich lat uświadomiły, że podstawowe elementy śmierci apoptycznej, to jest kaspazy i CAD, występują w cytoplazmie wszystkich komórek organizmu w formie nie-

aktywnej. W określonych warunkach białka te przechodzą proces natychmiastowej aktywacji umożliwiając śmierć komórek, w których się znajdują. W przeciwieństwie do coraz bardziej przejrzystego przebiegu efektorowej fazy apoptozy, mechanizmy regulacyjne, które decydują o życiu lub śmierci komórki nadal pozostają całkowicie nieznane. Niewątpliwie, każda komórka znajduje się pod nieustannym wpływem niezliczonych bodźców wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, w integracji których uczestniczy ogromna liczba komponentów komórkowych i dróg sygnałowych. Przypuszcza się, że ostatecznym odbiorcą tych sygnałów, po ich odpowiednim przetworzeniu, są białka pro- i anty-apoptyczne z rodziny Bcl-2, których wzajemne relacje funkcjonalne i ilościowe podlegają nieustannym modyfikacjom, umożliwiając bądź utrzymanie *status quo* i kontynuację życia, bądź prowadząc do uwalniania cytochromu c z mitochondriów i śmierci komórki (TSUJIMOTO 1998).

APOPTOZA W POWSTAWANIU I LECZENIU CHOROÓB CZŁOWIEKA

Zrozumienie mechanizmów śmierci komórkowej jest ważne nie tylko z racji powszechnego występowania apoptozy w rozwoju organizmów zwierzęcych, lecz także ze względu na udział apoptozy w etiologii wielu chorób człowieka. W prawidłowo funkcjonującym organizmie śmierć i podziały komórkowe są ściśle zrównoważone utrzymując populację komórkową w poszczególnych tkankach i narządach na pożądanym poziomie. Zaburzenia tej równowagi prowadzą do patologicznego ubytku komórek bądź ich nadmiaru i związanych z tym stanów chorobowych (THOMPSON 1995). Do grupy chorób wynikających z nadmiernej apoptozy zalicza się między innymi różne formy schorzeń neurodegeneratywnych i AIDS, zaś do drugiej grupy, związanej z niedostateczną apoptozą, między innymi choroby autoimmunologiczne i nowotwory. Schorzenia neurodegeneratywne, powodowane stopniową utratą komórek nerwowych na skutek apoptozy, obejmują między innymi choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona oraz różne formy degeneracji mózdzku czy nerwów ruchowych rdzenia kręgowego. Podłoże molekularne tych chorób jest na ogół nieznane. Chorobą o ogromnym znaczeniu społecznym, w trakcie której dochodzi do nadmiernej apoptozy, jest AIDS. Rozwój AIDS jest bezpośrednio związany z utratą tak zwanych pomocniczych komórek T (ang. helper T cells), które ulegają apoptozie w odpowiedzi na rozregulowaną stymulację

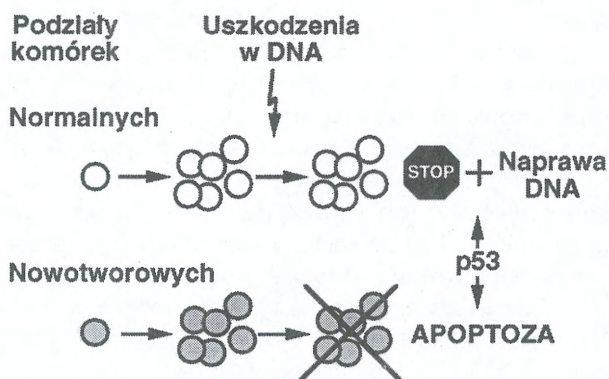
ich receptora CD4 przez białko gp120 otoczki wirusa HIV. Typowymi stanami patologicznymi związanymi ze śmiercią komórkową są ponadto zawał serca i wylew, których efektem jest częściowe niedokrwienie organów i śmierć komórek na skutek zarówno apoptozy, jak i nekrozy. Wzmoczona apoptoza może mieć także związek z postępującą utratą chondrocytów w osteoporozie. Apoptoza hepatocytów stymulowana przez takie toksyny jak alkohol, prowadzi z kolei do postępującego uszkodzenia funkcji wątroby.

Najpowszechniejszą chorobą, związaną z niedostatecznym tempem apoptozy jest rozwój nowotworów. Prawidłowo regulowana apoptoza uważana jest obecnie za jeden z pierwszoplanowych mechanizmów obronnych, umożliwiających skuteczną eliminację powstających w organizmie komórek nowotworowych. Sygnałem, który prowadzi do uruchomienia programu śmierci apoptycznej w komórkach przechodzących transformację nowotworową jest nieskoordynowana z innymi zmianami komórkowymi aktywacja genów cyklu komórkowego, między innymi onkogenów. Zachodząca w takich przypadkach apoptoza kontrolowana jest przez białko p53, którego podstawową funkcją jest aktywacja transkrypcyjna niewielkiej grupy genów (LEVINE 1997). Białko p53 w odpowiedzi na zaburzenia w kontroli podziałów komórkowych wzmacnia ekspresję między innymi genu kodującego pro-apoptyczne białko Bax, pośred-

nio powodując uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i aktywację kaspaz w transformowanych komórkach.

Rygorystyczna kontrola funkcjonalnej integralności genomu za pośrednictwem białka p53 nie stanowi niestety bezwzględnie i niezawodnego zabezpieczenia przed powstawaniem komórek nowotworowych. Część z nich wyłamuje się spod nadzorczej funkcji białka p53 i kontynuuje podziały prowadząc do rozwoju choroby nowotworowej. Komórki nowotworowe podlegające szybkim cyklom replikacyjnym na skutek zaktywowanych onkogenów wykazują jednak, w odróżnieniu od prawidłowo dzielących się komórek organizmu, znacznie podwyższoną wrażliwość na czynniki uszkodzające DNA lub zakłócające metabolizm kwasów nukleinowych. Do grupy tej zaliczają się między innymi związki alkilujące DNA (na przykład mitomycyna C), czynniki interkalujące (np. aktynomycyna D), kompleksy metali (np. cis-platyna), analogi nukleozydów (np. 5-fluorouracyl) oraz promieniowanie jonizujące. Komórki nowotworowe w obecności już niewielkich dawek każdego z tych czynników, łatwo tolerowanych przez komórki prawidłowe, przechodzą natychmiastową apoptozę w indukcji której główna rola ponownie przypada białku p53. Indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych w obecności czynników wpływających na metabolizm DNA znajduje wytlumaczenie w tak zwanej hipotezie konfliktu (FISHER 1994). Zgodnie z tą hipotezą w komórkach nowotworowych dochodzi do integracji dwóch sprzecznych sygnałów wzrostowych: jednego, napędzającego podziały komórkowe w wyniku aktywacji onkogenów i drugiego (nadzorowanego podobnie jak indukcja apoptozy, przez białko p53), nakazującego komórce zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę DNA (Ryc. 3). Podczas gdy obecność uszkodzeń w DNA w dzielących się prawidłowo komórkach prowadzi do represji genów cyklu komórkowego, zahamowania podziałów i naprawy uszkodzeń, w komórkach nowotworowych nieprawidłowo stymulowanych do podziałów zaktywowanymi onkogenami, odpowiedzią jest apoptoza. W przeciwieństwie do organizmów jednokomórkowych, podwyższona wrażliwość komórek nowotworowych nie wynika zatem z letalnego efektu uszkodzeń, lecz z uruchomienia wewnętrznego programu śmierci apoptycznej. Zdolność czynników chemicznych i fizycznych zakłócających metabolizm DNA do indukowania apoptozy komórek nowotworowych, lecz nie komórek prawidłowych, leży u podstaw skuteczności chemoterapii i naświetlania, dwóch podstawowych metod leczenia nowotworów. Zgodnie z

powszechną jeszcze do niedawna opinią, skuteczność takich terapii wynikała z selektywnej śmierci szybko dzielących się komórek. Warto podkreślić, że dodatkową zaletą eliminowania komórek nowotworowych za pomocą indukowanej apoptozy jest ich szybka i bezobjawowa resorpcja przez otaczające komórki i brak stanów zapalnych, typowych dla nekrozy. Niestety, ta skuteczna i pożądana metoda leczenia nie znajduje zastosowania w przypadku tych wszystkich nowotworów, w których następuje inaktywacja białka p53 i zablokowanie jego zdolności do indukowanej apoptozy. Zmiany w genie p53 stwierdzono w ponad połowie z około 2500 przeanalizowanych ludzkich nowotworów i linii komórkowych (LEVINE 1997). W komórkach pozbawionych funkcjonalnego białka p53, obecność uszkodzeń DNA indukowanych za pomocą promieniowania jonizującego lub czynników chemicznych nie prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i replikacji, wzmagając w konsekwencji destabilizację genetyczną. Jej typowymi objawami jest wielokrotnie zwiększona częstość mutacji spontanicznych oraz delecji, duplikacji i translokacji chromosomalnych. Wzrost niestabilności genetycznej jest czynnikiem sprzyjającym powstawaniu fenotypu



Ryc. 3. Model ilustrujący hipotezę „konfliktu”.

Obecność uszkodzeń DNA w prawidłowo dzielących się komórkach prowadzi do zależnego od białka p53 zablokowania cyklu komórkowego i rozpoczęcia naprawy DNA. Komórki nowotworowe, niezdolne do zahamowania cyklu komórkowego w wyniku niekontrolowanej aktywacji onkogenów, przechodzą w tych warunkach apoptozę, także zależną od białka p53.

charakterystycznego dla późnych etapów rozwoju nowotworów, to jest zdolności do przerzutów i naciekania innych tkanek. Stosowanie chemoterapii i naświetlania w leczeniu nowotworów pozbawionych białka p53 może zatem prowadzić do wzrostu inwazyjności komórek zamiast do ich eliminacji, to jest przynosić skutki odwrotne do zamierzonych. Przykład ten

wskazuje na bezsporne korzyści jakie może przynieść pełniejsza koordynacja działań klinicznych z wiedzą o zmianach genetycznych, zachodzących w określonych typach nowotworów.

Apoptoza kontrolowana przez p53 stanowi także potężny oręż organizmów zwierzęcych w walce z wirusami onkogennymi (WHITE 1993). Apoptoza zainfekowanych komórek ma prawdziwie altruistyczny charakter, bowiem zapobiega rozprzestrzenianiu wirusa na sąsiednie komórki i uniemożliwia transformację nowotworową, chroniąc przed śmiercią cały organizm. Niektóre z tych wirusów, na przykład adenowirus, wirus SV40 i EBV (ang. Epstein-Barr virus) kodują białka, których zadaniem jest powstrzymanie apoptozy zainfekowanych komórek i przedłużenie czasu niezbędnego dla namnożenia wirionów. Genom adenowirusa koduje na przykład aż dwa białka hamujące apoptozę zainfekowanych komórek za pomocą niezależnych mechanizmów. Jedno z białek czyni to poprzez bezpośrednie wiązanie się z p53 i znoszenie jego zdolności do transkrypcyjnej aktywacji genów pro-apoptycznych, podczas gdy drugie jest odpowiednikiem komórkowego anty-apoptycznego białka Bcl-2. Niektóre z wirusów wyspecjalizowały się w produkcji białek blokujących funkcję kaspaz. Analiza mechanizmów wykorzystywanych przez wirusy w celu powstrzymania apoptozy komórek stanowi nie tylko cenne źródło informacji o mechanizmach śmierci komórkowej, lecz także może mieć znaczenie praktyczne, umożliwiając w przyszłości skuteczną walkę z niektórymi wirusami onkogennymi.

Korzyści terapeutyczne wynikające z indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych skłoniły do poszukiwania skutecznych metod przeciwnego działania, to jest ograniczania

apoptozy w stanach chorobowych wynikających z jej nadmiernego tempa. Jeszcze do niedawna ogromne nadzieje wiązano na przykład z zastosowaniem niskocząsteczkowych inhibitorów kaspaz jako skutecznego środka w zapobieganiu pozawałowych i poudarowych uszkodzeń mięśnia sercowego i innych narządów na skutek apoptozy niedotlenionych komórek. Do grupy silnych inhibitorów, zdolnych do przenikania do wnętrza komórek, należą między innymi zmodyfikowane chemicznie peptydy, składające się z 4 aminokwasów o sekwencji specyficznie rozpoznawanej przez poszczególne kaspazy (NICHOLSON i THORNBERRY 1997). Niestety, w świetle ostatnich badań inhibitory takie, choć skuteczne w hamowaniu aktywności kaspaz, nie chronią komórek przed śmiercią powodowaną przez uwalnianie cytochromu c do cytozolu i stopniową degeneracją mitochondriów (REED 1998). Zachodząca w takich przypadkach śmierć komórek przypomina nekrozę i może prowadzić do wystąpienia reakcji zapalnej, czyniąc terapię za pomocą inhibitorów kaspaz bardziej szkodliwą niż pożyteczną. Bardziej obiecujące wydają się działania polegające na blokowaniu apoptozy na etapie wstępnym, poprzedzającym aktywację kaspaz, na przykład poprzez indukcję anty-apoptycznych białek z rodziny Bcl-2 lub specyficzną inhibicję ich antagonistów. Nadchodzące lata wykażą, czy rosnąca w lawinowym tempie wiedza o mechanizmach apoptozy doprowadzi do opracowania skutecznych środków farmakologicznych i metod leczenia chorób, których podłożem są zaburzenia w genetycznie zaprogramowanej śmierci komórek.

Serdecznie dziękuję kolegom i koleżankom z Chapel Hill za krytyczną analizę tekstu.

APOPTOSIS: THE SIGNIFICANCE OF CELL DEATH IN THE LIFE OF ANIMALS

Summary

Cells can die by necrosis or apoptosis. Necrosis is accidental and pathological and occurs as a result of severe tissue injury. At the molecular level, necrosis is caused by rapid depletion of ATP and inability of the plasma membrane to regulate osmotic pressure. Cells swell and rupture due to uncontrolled influx of water and ions. Release of the cellular content into the surrounding space leads to an inflammatory response often causing secondary tissue damage. Unlike necrosis, apoptosis is a highly ordered process of physiological cell death dependent on a constant supply of ATP. Apoptosis is used for controlled deletion of unwanted cells and plays a fundamental role during early stages of development, allowing for body sculpturing and tissue remodeling. Apoptosis is also important during adulthood for maintaining the tissue homeostasis and adjusting the number of cells to the current needs of the

organism. Finally, apoptosis has a protective function by allowing removal of potentially harmful cells, such as transformed and virally infected cells. Apoptosis results from activation of a genetically encoded and evolutionarily conserved suicide program that leads to a series of distinct morphological and biochemical changes. Typical morphological changes include rapid cell condensation and plasma membrane blebbing. The hallmark of the biochemical changes associated with apoptosis is the fragmentation of DNA into multimers of 200 base pairs the chromatin being cleaved within interchromosomal sites. In the final stage of apoptosis, the dying cells are divided into small, membrane-bound apoptotic bodies, which are rapidly phagocytosed by neighboring cells and cause no inflammation. The basic components of apoptosis were first identified in the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. In the center of the

apoptotic cell death machinery are caspases, a family of novel cysteine proteases with specificity for aspartate residues. Activation of these proteases by various mechanisms results in a highly orchestrated and hierarchical process of disassembling of cellular structures and inactivating the key metabolic processes. In mammalian cells,

activation of caspases is regulated by a Bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic proteins, as well as cytochrome c, which is rapidly released from mitochondria in response to apoptotic stimuli. Inappropriate apoptosis contributes to many human diseases, including AIDS, cancer, neurodegenerative disorders, and cardio-vascular injury.

LITERATURA

- AMEISEN J. C., 1996. *The origin of programmed cell death*. Science 272, 1278-1279.
- ARENDTS M. J., WYLLIE A. H., 1991. *Apoptosis: mechanism and roles in pathology*. Int. Rev. Exp. Pathol. 32, 223-254.
- CRYNS V., YUAN J., 1998. *Proteases to die for*. Genes & Dev. 12, 1551-1570.
- ELLIS R. E., YUAN J., HORVITZ H. R., 1991. *Mechanisms and functions of cell death*. Ann. Rev. Cell Biol. 7, 663-698.
- FISHER D. E., 1994. *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. Cell 78, 539-542.
- HENGARTNER M. O., 1997. *CED-4 is a stranger no more*. Nature 388, 714-715.
- HENGARTNER M. O., HORVITZ H. R., 1994. *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2*. Cell 76, 665-676.
- JACOBSON M. D., WEIL M., RAFF M. C., 1997. *Programmed cell death in animal development*. Cell 88, 347-354.
- KERR, J. F. R., 1971. *Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death*. J. Path. 105, 13-20.
- KERR J. F. R., WYLLIE A. H., CURRIE A. R., 1972. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer 26, 239-257.
- LEVINE A. J., 1997. *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell 88, 323-331.
- NAGATA S., 1997. *Apoptosis by death factor*. Cell 88, 355-365.
- NICHOLSON D. W., THORNBERRY N. A., 1997. *Caspases: killer proteases*. Trends Bioch. Sci. 22, 299-306.
- REED, J. C., 1997. *Cytochrome c: can't live with it-can't live without it*. Cell 91, 559-562.
- REED J. C., 1998. *Bcl-2 family proteins*. Oncogene 17, 3225-3236.
- THOMPSON C. B., 1995. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science 267, 1456-1462.
- TSUJIMOTO Y., 1998. *Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?* Genes to Cells 3, 697-707.
- WHITE, E., 1993. *Death-defying act: a meeting review on apoptosis*. Genes & Dev. 7, 2277-2284.
- WYLLIE A., 1998. *An endonuclease at last*. Nature 391, 20-21.
- WYLLIE A. H., KERR J. F. R., CURRIE A. R., 1980. *Cell death: the significance of apoptosis*. Int. Rev. Cyt. 68., 251-306.
- YUAN J., SHAHAM S., LEDOUX S., ELLIS H. M., HORVITZ H. R., 1993. *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme*. Cell 75, 641-652.