

MOLEKULARNI ASPEKTI APOPTOZE

NIKOLA RADOVIĆ, SNJEŽANA ČUČIĆ¹ i SILVIO ALTARAC²

Odjel za urologiju, Klinička bolnica Dubrava, ¹Odjel za farmakologiju i neškodljivost lijekova, Pliva, Zagreb
i ²Odjel za urologiju, Opća bolnica Zabok, Zabok, Hrvatska

S obzirom na njenu važnost u homeostazi broja stanica organizma, apoptoza je strogo regulirani proces. Vanstanične i unutarstanične molekule višekratnim mehanizmima reguliraju taj proces. Tijekom posljednjih pet godina učinjen je ogroman napredak u razumijevanju apoptoze kao rezultata molekulskih procesa. Biokemijska aktivacija tih ključnih komponenti programa stanične smrti odgovorna je za morfološke promjene primijećene kod apoptoze koje uključuju oštećenje mitohondrija, raspad jezgrine membrane, fragmentaciju DNK, kondenzaciju kromatina i formiranje apoptotičkih tijela. Središnju ulogu u procesu apoptoze imaju kaspaze. One se uglavnom nalaze kao inaktivni proenzimi (prokaspaze) u citoplazmi stanice i mitohondrijima, a postepeno se aktiviraju tijekom apoptotskog procesa. Sve apoptotičke kaspaze postoje u normalnim stanicama kao neaktivni enzimi, a kada stanice prolaze apoptozu, te se kaspaze aktiviraju. Trenutno postoje dvije dobro karakterizirane kaskade koje aktiviraju kaspaze i reguliraju apoptozu: jednu potiče stanični površinski receptor za smrt, a drugu promjene integriteta mitohondrija.

Ključne riječi: smrt stanice, apoptoza, kaspaze, površinski stanični receptori smrti, mitohondrij

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Nikola Radović, dr. med.
Jagodnjak 16a,
10000 Zagreb, Hrvatska
Mobitel: 091/5218271; faks: 01/4684648
E-pošta: nikola.radovic@zg.htnet.hr

MOLEKULARNA REGULACIJA APOPTOZE

S obzirom na važnost broja stanica u homeostazi organizma, apoptoza je strogo regulirani proces. Određene molekule unutar stanice ili u njezinoj okolini mogu utjecati na regulaciju apoptoze.

Vanstanični čimbenici regulacije apoptoze

Neki citokini u mikrookolini stanice su važni čimbenici koji mogu poticati preživljavanje ili apoptotsko odumiranje stanice.

Vanstanični čimbenici koji potiču preživljavanje stanice. Čimbenici preživljavanja specifični su za određeni tip stanica i funkciju koju obavljaju. U mezangijskim stanicama bubrega čovjeka i štakora, citokini koji predstavljaju čimbenike preživljavanja su: IGF-1 (čimbenik rasta sličan inzulinu — engl. Inzulin-like Growth Factor), IGF-II, te FGF (fibroblastni čimbenik rasta — engl. Fibroblast Growth Factor, dok EGF (epidermalni čimbenik rasta — engl. Epidermal Growth Factor), PDGF (trombocitni čimbenik rasta — engl. Platelet Derived Growth Factor) i TGFβ1 (transformirajući čimbenik rasta — engl. Transforming Growth Factor) nemaju većeg značenja (1).

Kolagen IV, te laminin, sastavni dijelovi vanstaničnog matriksa normalnog mezangija, čuvaju mezangijske stanice štakora od apoptoze (2).

Vanstanični čimbenici koji potiču smrt stanice. Clusterin (SGP40) je jedan od najranijih proteina čije je lučenje povezano s pojavom apoptoze. Iako je njegovo značenje godinama bilo nepoznato, sada se zna da je clusterin multifunkcijski protein koji djeluje protektivno na apoptozu u pokusima *in vitro* i *in vivo* (3).

Citokini TNF (čimbenik nekroze tumora — engl. Tumor Necrosis Factor) i Fas, potiču smrt stanice tako da se vežu na receptore smrti stanične membrane i potom ih aktiviraju (4).

Djelovanje TNF i FasL dosta je proučavano na stanicama bubrega. U bubregu se oba citokina mogu sintetizirati infiltracijom leukocita i intrinzičnih bubrežnih stanica (5). Glavni izvor intrinzičnog FasL su epitelne stanice tubula (6). Dokazano je da TNF i FasL mogu potaknuti apoptozu mezangijskih stanica kao i stanica tubularnog epitela, bubrežnog endotela i bubrežnih fibroblasta (7). Pokretanja procesa stanične smrti tih tipova stanica ovisi o mikrookruženju stanica. U tipičnim uvjetima stanice tubula su prilično otporne na nastanak apoptoze potaknute FasL-om, što je i za očekivanje s obzirom da one same luče te citokine (8).

Unutarstanični čimbenici regulacije apoptoze

Unutarstanična regulacija apoptoze jedan je od glavnih predmeta istraživanja u biomedicini. Iako su neki mehanizmi poznati, veći dio te cjeline tek treba upoznati. Unutarstanična regulacija apoptoze je proces tipičan za pojedine vrste organizama kao i za funkcije proteina.

Ispitivanja nematoda (valjkasti crvi) ukazala su na ulogu proteina CED-3, CED-4, CED-9, i EGL-1 u apoptozi (9, 10).

Kao što je već istaknuto apoptoza između ostalog nastaje aktivacijom enzima ovisnih o koncentraciji kalcija. Pored endonukleaze, u procesima staničnih promjena i oblikovanju apoptotskih tjelesaca sudjeluje kalpain (proteaza) i transglutaminaza. Takve se unutarstanične metaboličke promjene mogu

pokrenuti receptorskim membranskim signalima, putem drugih glasnika, ili kemijskim i fizičkim čimbenicima izravno u jezgri.

Kada je mikrookolina stanice predodređena za apoptozu dolazi do aktiviranja intracelularnih čimbenika u procesu stanične smrti, kao što su: kaspaze, članovi porodice *Bcl2* proteina svojim djelovanjem na mitohondrije, protein Apaf-1/CED-4 koji prenosi signale integrirane od strane proteina porodice *Bcl-2* do kaspaza (10).

Interakcija između čimbenika smrti i preživljavanja

Kakva će interakcija između čimbenika preživljavanja i čimbenika smrti u mikrookolini stanice prevladati, ovisi o jačini stimulansa i specifičnosti stanice.

Odsustvo čimbenika preživljavanja može povećati vjerojatnost smrti bubrežnih stanica koje su inducirane citokinima smrti ili nefrotoksičnim lijekovima. Čimbenici preživljavanja IGF-1 i IGF-2, za razliku od FGF, čuvaju stanice od tvari koji razaraju DNK i inhibitora sinteze proteina (11). Ni jedan od njih ne prevenira apoptozu koja je inducirana Fas-om. Za razliku od njih, čimbenici preživljavanja koji su prisutni u serumu ili sami citokini kao što je IGF-1 čuvaju stanice tubularnog epitela i bubrežne fibroblaste od TNF i apoptoze potaknute Fas-om. Sadržaj seruma čuva stanice tubula od apoptoze, ako je apoptoza potaknuta nefrotoksičnim tvarima i često se upotrebljava kao izvor čimbenika za preživljavanje u eksperimentima s kulturom nekih stanica (12).

KASPAZE

Proces apoptoze kontroliran je složenim sustavom u kojem važnu ulogu zauzimaju kaspaze. Kaspaze (engl. Cysteine-requiring Aspartate protease), enzimi citoplazme, spadaju u obitelj proteaza koje sudjeluju u započinjanju i izvršenju apoptoze. Postoji veliki broj čimbenika koji potiču apoptozu i prenose signale kroz citoplazmu pomoću posredničkih molekula, a krajnji učinak je aktivacija kaspaza koja je izvršna molekula za apoptozu (13).

Za sada je poznato 14, a u sisavaca 12 gena koji kodiraju enzime koji se zajedničkim imenom zovu kaspaze (14). Istraživanje genske kontrole programirane stanične smrti u crva *Caenorhabditis elegans*, bio je dobar model apoptotičnih promjena koje se zbivaju i u kralješnjaka. Kada se protein cijepa na određenom mjestu, gubi svoju funkciju i to dovodi do funkcijskih i strukturnih oštećenja stanice (15).

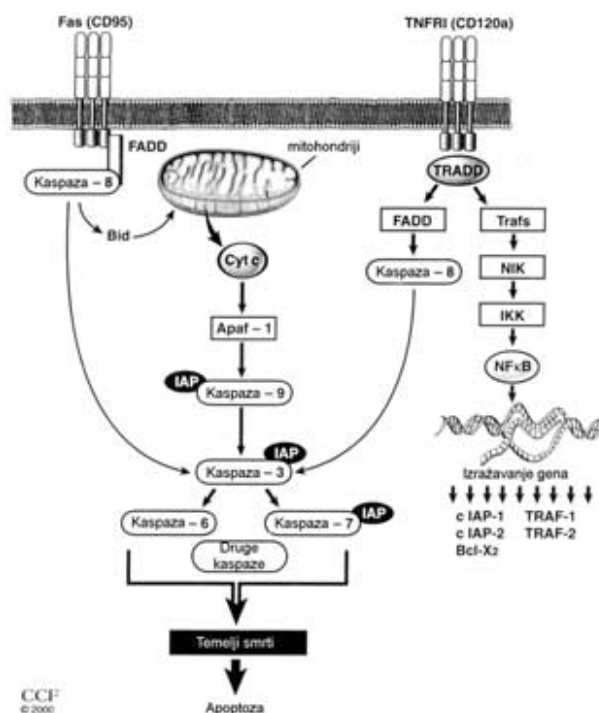
Aktivacija kaspaza odvija se kaskadno; jedna kaspaza aktivira drugu, druga treću itd. Postoje tri oblika kaspaza: 1) aktivatori citokina 2) inicijacijske, 3) izvršne (egzekucijske, efektorne). Aktivatori citokina su manje poznati, (kaspaze 1, 4, 5, 11, i 12), a potiču ne samo apoptozu nego i funkciju citokina (16). Inicijatori (kaspaze 2, 8, 9, 10) se nalaze uzvodno na kaskadi aktivacije kaspaza, a mogu biti individualno aktivirane mnogim apoptotskim signalima u sklopu različitih mehanizama u procesu umiranja.

Jednom aktivirane mogu inicirati kaskadu kaspaza aktivirajući nizvodno izvršne kaspaze, koje su uključene u regulaciju i izvršenje apoptoze (kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) (17). Izvršne kaspaze mogu cijepati brojne stanične supstrate, uključujući strukturne proteine koji su dio citoskeleta (aktin, fodrin, APC) i ovojnice jezgara (laminini), stanične enzime potrebne za obnavljanje DNA i za homeostazu stanice (18). Od svih izvršnih kaspaza najbolje je proučena kaspaza-3 i predstavlja središnju molekulu na križanju svih poznatih apoptotskih mehanizama (18).

U normalnim stanicama kaspaze postoje u latentnom obliku (prokaspaze), kao neaktivni enzimi, a kada stanice prolaze apoptozu, te kaspaze se aktiviraju. Trenutno postoje dvije dobro karakterizirane kaskade koje aktiviraju kaspaze, i koje reguliraju apoptozu: jednu potiče stanični površinski receptor za smrt, a drugu promjene integriteta mitohondrija.

Aktivacija kaspaza preko staničnih površinskih receptora za smrt

Stanični površinski receptori za smrt sa njihovim specifičnim ligandima mogu biti put koji vodi do aktivacije kaspaza. Stanični površinski receptori za smrt su porodica transmembranskih proteina koji pripadaju porodici receptora čimbenika tumorske nekroze (TNF) (4). Ti receptori u svojim izvanstaničnim domenama dijele slijedove koji sadrže cistein. Iako su regije s najvećom homolognošću sekvenci



Sl. 1. Shematski prikaz Fas i receptora čimbenika nekroze tumora-1 u aktivaciji apoptotičnog procesa.

Prilagođeno: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr., Wein AJ. Campbell's Urology. Philadelphia: London: New York: St. Louis: Sydney: Toronto; Saunders; 2002, 326.

između članova superporodice izvanstanične, Fas i TNFR1 dijele regiju homolognosti i na strani citoplazme (68 aminokiselina) koja se naziva domena za smrt. Ta je domena, kao što će biti kasnije opisano, potrebna za apoptotsko signaliziranje Fas-u i TNFR-u 1. Aktivacijski ligandi za te receptore za smrt su strukturno povezane molekule koje pripadaju porodici gena TNF (19). Kada Fas receptor vezuje svoj ligand, taj se događaj prepoznavanja prevodi u unutarstanične signale koji na kraju dovode do aktivacije kaspaza. Dakle, postoje tri koraka: ligandom–potaknuta trimerizacija receptora, novačenje unutarstaničnih proteina povezanih uz receptor i poticanje aktivacije kaspaza. Iz toga proizlazi da vezivanje FasL na Fas receptor potiče trimerizaciju proteina Fas. Citoplazmatska regija proteina Fas, koja sadrži domen za smrt (DD, engl. Death Domain), novači adaptorske molekule označene kao FADD (protein koji vezuje Fas s domenom za smrt, engl. Fas-Associating Protein with Death Domain). FADD također sadrži domen za smrt na svom C–kraju i veže se uz Fas putem međusobnog djelovanja između domena za smrt. Naknadno je identificirano nekoliko drugih novih proteina koji sadrže homologne domene za smrt, uključujući TRADD (domena za smrt povezana uz receptor za TNF, engl. TNF–Receptor–Associated Death Domain), RIP (protein koji međusobno djeluje s receptorom, engl. Receptor Interacting Protein)(20).

Dok je domena za smrt kod FADD neophodna za fizičku svezu s kompleksom ligand–receptor za smrt (engl. Ligand Bound–Death Receptor Complex) signalni kompleks koji pokreće smrt ili DISC, (engl. Death–Inducing Signaling Complex), N–kraj proteina FADD, koji se naziva izvršna domena za smrt (DED, engl. Death Effector Domain), od kritične je važnosti za novačenje na višoj razini prokaspaza kao što su prokaspaze–8 i/ili prokaspaze–10. Prokaspaza–8 sadrži dvije izvršne domene za smrt (DED domene) u regiji N–kraja kroz koje vezuje protein FADD. C–terminalna domena prokaspaze–8 sadrži kaspazi homolognu regiju. Nakon novačenja, prokaspaza–8 se proteolitički obrađuje do aktivnih oblika, te se sastoji od velikih i malih katalitičkih podjedinica (21). Dosta je dokaza koji sugeriraju da se prokaspaza–8 može proteolitički aktivirati oligomerizacijom nakon njezinog novačenja u signalni kompleks koji pokreće smrt (DISC) (22).

NFkapaB se nalazi u citoplazmi raznovrsnih stanica vezan za inhibicijsku molekulu IKB. Čimbenici aktivacije potiču odvajanje IKB, pa oslobođeni NFkapaB putuje u jezgru i veže se za pobuđivače gena koje aktivira (23, 24). Uloga NFkapaB u preživljavanju stanice proučavana je na miševima s uklonjenim genima vezanim za djelovanje NFkapaB (25). Osjetljivost na apoptozu koju posreduje Fas također se pojačava u stanicama u kojima je oslabljeno aktiviranje NFkapaB.

Povećana osjetljivost na apoptozu u stanica s uklonjenim NFkapaB posljedica je njegovog djelovanja na ekspresiju gena s antiapoptotskim učinkom

(26). Tu su na prvom mjestu TNFR–pridruženi čimbenici 1 i 2 (TRAF–1 i TRAF–2) koji su udruženi s citoplazmatskim dijelom članova obitelji TNFR. TRAF–2 potiče signalne mehanizme za aktivaciju NFkapaB, dok TRAF–1 potiče NFkapaB na indukciju staničnih proteina koji inhibiraju apoptozu (cIAP–1 i cIAP–2–engl. Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins). Ti se proteini direktno vežu i neutraliziraju kaspaze–3, –7 i –9, a smatra se da imaju i druge antiapoptotske uloge kao prijenosnici signala. Pretjerana ekspresija TRAF–1, TRAF–2, cIAP–1 i cIAP–2 može spriječiti apoptozu koja je primjećena kada je aktivacija NFkapaB potisnuta u stanicama osjetljivim na TNF (sl. 1).

Druge antiapoptotske molekule s izražavanjem zavisnim od NFkapaB uključuju Bcl–2, Bcl–XL i Bfl–1/A1, članove porodice proteina Bcl. Dok su neki članovi porodice proapoptotski, poznato je da te molekule djeluju i antiapoptotski kada apoptozu potiču posrednici koji djeluju na permeabilnost membrane mitohondrija (engl. Mitochondrial Permeability Transition), a također je otkriveno da spriječavaju aktivaciju kaspaze–9. Razine relativne ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih članova porodice Bcl–2 imaju značajan učinak na preživljenje stanice (27).

Uloga mitohondrija u apoptozi

Osim putem staničnih receptora, još je jedan put aktivacije kaspaza otkriven tako što je primijećeno da dodavanje ATP–a (adenozin trifosfat), ili još bolje dATP–a (deoksiadenozin trifosfat), u ekstrakte stanica pripremljenih iz normalno rastućih stanica, potiče program apoptoze, a što je mjereno aktivacijom kaspaze–3 i fragmentacijom DNA (28). Biokemijski eksperimenti frakcioniranja i rekonstituiranja doveli su do identifikacije triju proteina koji su neophodni i dovoljni za aktiviranje kaspaze–3 in vitro.

Metodama apsorpcije spektra, sekvencioniranja proteina i imunoreaktivnosti identificiran je prvi proteinski čimbenik kao humani citokrom c. Citokrom c izoliran iz drugih izvora od sisavaca može zamijeniti humani citokrom c kod aktivnosti aktivacije kaspaze–3 (28). U skladu s tim zapažanjima, pokazalo se da se citokrom c otpušta iz mitohondrija u stanicama koje prolaze apoptozu na poticaj niza podražaja, uključujući tvari koji oštećuju DNA, inhibitora kinaze i aktivatora staničnih površinskih receptora za smrt (29).

Od posebnog je značenja u aktivaciji kaspaza uloga mitohondrijskog proteina Smac/DIABLO koji vežući na sebe proteinske inhibitory apoptoze, IAP (engl. Inhibitor Apoptosis Protein) poništava njihovu inhibirajuću aktivnost u procesu apoptoze (30).

Apaf–1 je protein veličine 130–kDa koji se sastoji od tri različite domene. Osamdeset i pet aminokiselina na N–kraju pokazuje homolognost s prodomenom nekih kaspaza kao što su kaspaza–1, kaspaza–2 i kaspaza–9. Vjerojatna funkcija ove domene je da ona djeluje kao domena za novačenje kaspaza (CARD, engl. Caspase Recruitment Domain) (CARD) (31). Od svih kaspaza koje nose CARD, samo pro-

kaspazu-9 aktivira Apaf-1 (32). Nakon CARD, Apaf-1 sadrži niz od 310 aminokiselina koji pokazuje 50–postotnu sličnost u primarnoj sekvenci aminokiselina s CED-4, proteinom koji pospješuje smrt, kod *C. elegans*. Mutacije na ovom mjestu gdje se vezuju nukleotidi ukidaju i funkciju Apaf-1 i CED-4 (33, 34). Apaf-1 vezuje i hidrolizira ATP u ADP i dATP u dADP. Međutim, ta hidroliza nema funkcionalnu posljedicu, ako je citokrom c odsutan. Za razliku od toga, uz prisutnost citokroma c, vezanje i hidroliza ATP/dATP pospješuje formiranje multimerskog kompleksa Apaf-1/citokrom c. Taj je multimerski kompleks potpuno funkcionalan kod novačenja i aktiviranja prokaspaze-9 (34). Stoga, formiranje multimerskog kompleksa Apaf-1/citokrom c predstavlja obvezujući korak u aktivaciji kaspaza.

Na kraju, aktivirana kaspaza-9 nakon toga se otpušta iz tog kompleksa kako bi cijepala i aktivirala na nižoj razini kaspaze poput kaspaze-3, -6 i -7. U miševa koji ne mogu sintetizirati Apaf-1, kaspaza-9 i kaspaza-3 ne mogu biti aktivirane kao odgovor na različite poticaje na apoptozu, iako još uvijek dolazi do otpuštanja citokroma c. Isto tako, aktiviranje kaspaze-3 je nemoguće u miševa koji ne mogu sintetizirati kaspazu-9 (35).

Glavne molekule koje se otpuštaju u citosol iz mitohondrija, a kao odgovor na poticaj za smrt u procesu apoptoze posredovane mitohondrijima su citokrom c i Smac (36). U studiji Chuanga i sur. na glatko mišićnim stanicama opstruiranog uretera dokazano je da je izražavanje citokroma c koreliralo s brojem apoptotskih stanica i izražavanjem kaspaza -3, -8 i -9 (37). Kaspaza-8 mogla bi, potaknuta otpuštanjem citokroma c cijepati Bcl aktivirajući protein (Bid), a na nižoj razini izravno obrađivati efektorske kaspaze -9 (38). Otpuštanje citokroma c pospješuje Apaf-1-posredovanu aktivaciju kaspaze-9, koja potom cijepa kaspazu-3. Korelacije između ekspresije citokroma c, apoptotskih stanica i ekspresije kaspaza sugeriraju da se apoptoza miocita u opstruiranim ureterima događa uglavnom putem mitohondrija (37).

Kako Bid posreduje u komunikaciji između aktivirane kaspaze-8 i mitohondrijskog procesa smrti? Aktivacija kaspaze-8 može potaknuti dva puta koja dovode do aktivacije kaspaza na nižoj razini: a) Neposredna aktivacija kaspaza na nižoj razini kao što su kaspaza-3, -6 i -7. Taj je put predominantan kada je koncentracija kaspaza-8 visoka (39). S druge strane, kaspaza-8 može aktivirati kaspaze na nižoj razini neizravno potičući otpuštanje citokroma c iz mitohondrija što pokreće aktivaciju kaspaza kroz Apaf-1. b) Posredno, putem Bid-a koji je zavisen o otpuštanju citokroma c, a važan je korak u umnožavanju mitohondrija kod prisutnosti niske koncentracije kaspaza-8 (40). Osim kaspaze-8, druge kaspaze poput kaspaze-3 mogu također cijepati Bid. Bid rascijepljen kao rezultat proteolize od strane kaspaza koje nisu kaspaza-8 jednako je moćan u pokretanju otpuštanja citokroma c iz mitohondrija (38). To zapažanje sugerira da Bid može također imati ulogu u poja-

čavanju različitih apoptotskih signala uz signale koji dolaze iz staničnog površinskog receptora za smrt.

Nedavno je identificiran protein, Egl-1, u *C. elegans* kao komponenta puta stanične smrti na višoj razini od Ced-3 i Ced-4. Dokazano je da mutacija gena *egl-1* prevenira smrt somatske stanice tijekom razvoja nematode (41). Prvi korak u regulaciji od mitohondrija posredovane aktivacije kaspaza mogao bi biti na razini otpuštanja proteina citokroma c i Smac koji se normalno nalaze u intramembranskom prostoru mitohondrija, dok su njihovi kočimbenici, Apaf-1 i prokaspaza-9 i jedan i drugi citosolni proteini (42, 43).

Poznati regulatori otpuštanja proteina citokroma c i Smac su proteini porodice Bcl-2. Pretjerana izraženost Bcl-2 ili Bcl-xL blokira otpuštanje citokroma c i Smac kao odgovor na niz apoptotskih poticaja, dok proapoptotski članovi porodice proteina Bcl-2 poput Bax i Bid pospješuju njihovo otpuštanje (44).

Utjecaj Bcl-2 na apoptozu. Jedan od prvih gena uključen u kontrolu apoptoze, a isto tako i najviše do sada istraživani je onkogen *bcl-2*. Bcl-2 je akronim za »B-cell lymphoma/leukemia-2 gene«, prototip je porodice gena koji inhibiraju apoptozu. Prvi puta je identificiran u studiji translokacije kromosoma (14; 18), udružene s folikularnim, non-Hodkinovim, B-staničnim limfomom. Bcl-2 proteini mogu djelovati anti-apoptotički (Bcl-2, Bcl-xL, i Bcl-w) ili pro-apoptotički (Bax, Bak i Bok), a ukupno je danas poznato 25 gena Bcl-2 porodice (45).

Pokretanje apoptotičke smrti pod negativnom je regulacijom gena *bcl-2*, smještenog na 18. kromosomu. Na molekularnoj razini bjelančevina *bcl-2* koči razvoj mitohondrijske propusnosti, čime se zaustavlja razvitak programirane smrti stanice u ranoj pobudnoj fazi. Antiapoptotičkim učinkom proteina *bcl-2* u stanici povećava se otpornost na pro-apoptogene pobude. Protein *bcl-2* gena lociran je u jezgri i membrani, endoplazmatskom retikulumu, kao i u membrani mitohondrija, a nedavno je dokazano da blokira staničnu apoptozu induciranu vodikovim peroksidom, slobodnim radikalima i drugim kemijskim tvarima, sugerirajući da takav oksidativni stres može biti važan dio mehanizma apoptoze (46).

Član porodice *bcl-2* je i *bcl-x* gen koji šifrira dva funkcionalno različita proteina *bcl-xL* (blokirajući) i *bcl-xs* (stimulirajući) na apoptozu. Bcl-xL ima molekularnu dužinu i sekvencu kao i *bcl-2*, a djeluje na apoptozu inhibirajući kao i *bcl-2*. Član porodice *bcl-2* gena je i *bax* gen, prisutan u raznim tkivima, čije prejakno izražavanje ubrzava apoptozu potiskujući i blokirajući učinak *bcl-2* gena. Bax protein (Bcl-2 associated X protein) ima homolognu amino acidnu skupinu s *bcl-2* proteinom i veže se s njim ili sa samim sobom. Bax premda vrlo sličan *bcl-2* proteinu ubrzava apoptozu. Nakon apoptotičkog podražaja omjer *bax* prema *bcl-2* genu determinira preživljenje ili smrt; kada je aktivnost *bax* gena prejakno izražena suprotstavlja se inhibitornoj aktivnosti *bcl-2* gena i

stanica zbog predominacije bax gena ide u apoptozu (47).

Početni rad na ulozi mitohondrija u apoptozi otkrio je da su određeni znakovi oštećenja mitohondrija, kao što je gubitak membranskog potencijala, rani znak početka smrti stanice (48). Dosta je istraživanja temeljeno na tom saznanju gdje je opisana aktivnost propusnosti pora za prijelaz (PTP, engl. Permeability Transition Pore), čija je funkcija reguliranje potencijala unutarnje membrane mitohondrija. Nagađa se da kanal PTP regulira porodica Bcl-2 proteina (49). Raspad mitohondrija može biti posljedica poremećaja elektrostatičkog i osmotskog gradijenta, a zbog povišene koncentracije kalcija oslobođene iz endoplazmatskog retikuluma zbog djelovanja Bcl-2 i Bax proteina, ili djelovanjem enzima katepsina preko proapoptotskog proteina BIDa (49). Pokazalo se da farmakološki inhibitori kanala PTP, kao što je ciklosporin A, sprječavaju određene vrste poticaja na apoptozu, kao npr. poticaj stanične smrti djelovanjem Bax proteina (50).

Uloga proteina IAP. Sljedeći važni negativni regulatori apoptoze su porodica proteina inhibitora apoptoze (IAP, engl. Inhibitors of Apoptosis Proteins). Do danas su otkrivena dva inhibitora apoptoze u bakulovirusima (Cp-IAP i Op-IAP), dva kod drozofile (DIAP-1 i DIAP-2), i pet u ljudi (c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, survivin i NAIP). Pretjerana izraženost proteina IAP čini stanicu otpornom na velik niz poticaja na apoptozu (51). Točna meta inhibicije proteina IAP trenutno nije poznata, a moguća su barem dva načina djelovanja.

S jedne strane, oni sprječavaju apoptozu tako što se izravno upliću u katalitičku aktivnost određenih kaspaza, a s druge strane, pretjeranim izražavanjem IAP može se spriječiti obrada i aktivacija prokaspaza ili drugih proteina koji su neophodni za aktivaciju prokaspaza (52).

Nedavne studije na proteinima IAP u sisavaca daju važna rješenja za molekulske mehanizme aktivacije tih proteina, koji predstavljaju moćni inhibitor izvršne kaspaze-3 i -7. Ti proteini, međutim, ne inhibiraju kaspazu-1, -6, -8 ili -10 (53).

U sprezi s funkcijom kaspaze-9, ti se proteini u sisavaca vežu na neaktivne prokaspaze-9 i stvaraju aktivni oblik kaspaze -9 (54). Ti diferencijalni učinci proteina IAP sugeriraju da oni funkcioniraju na oba glavna načina izvršenja apoptoze, putem staničnog površinskog receptora za smrt i putem zavisnim o citokromu c (proteini Apaf). Kod puta preko staničnog površinskog receptora za smrt, proteini IAP blokiraju izvršnu (efektornu) kaspazu-3 i -7, te time zaustavljaju apoptozu potaknutu od kaspaze-8. Kod puta zavisnog od citokroma c (Apaf), proteini IAP djeluju na tri različita koraka: (a) kroz izravno međusobno djelovanje s prokaspazom-9 (b) kroz natjecanje za Apaf-1 vezujući se pomoću njihovih CARD i; (c) kroz direktno sprječavanje aktivnih kaspaza (34).

Proteini IAP očigledno pružaju mehanizam zaštite od minimalne aktivacije programa apoptoze. Drušim riječima, oni postavljaju razinu endogenog praga za aktivaciju kaspaze. Stanične razine proteina IAP mogu odrediti razliku u osjetljivosti na poticaje koji dovode do apoptoze u različitim vrstama stanica. Iz tog razloga, regulacija razina proteina IAP postaje važno pitanje u apoptozi. Dokazano je da su proteini c-IAP izravne mete transkripcijske regulacije pomoću NF κ B (55). Detaljnije i kompletne studije transkripcijske i post-transkripcijske regulacije proteina IAP trebale bi pružiti važne uvide u regulaciju apoptoze.

APOPTOZA U FIZIOLOŠKIM I PATOFIZIOLOŠKIM PROCESIMA

Apoptoza je temeljni način uklanjanja suviška stanica u fetalnom i embrijskom razvoju, hormonski pokrenutoj atrofiji tkiva pri smanjenju laktacijskih žlijezda nakon prestanka dojenja, endometrijskih decidualnih promjena, u održavanju tkivne arhitekture i dr. (56). U histološkim rezovima normalnih, zdravih tkiva može se naći vrlo malo apoptotskih tjelešaca.

Tkiva koja su funkcionalno ovisna o specifičnoj hormonskoj stimulaciji nakon pada razine trofičkog hormona procesom apoptoze dolaze u stanje involucije, odnosno atrofije. Pogodnim tkivom za proučavanje apoptotskih promjena stanice pokazala se nadbubrežna žlijezda. Pokusima na odraslim i fetalnim štakorima Wyllie i sur. su pokazali ovisnosti stanica kore nadbubrežne žlijezde o koncentraciji ACTH, gdje se broj stanica smanjivao usporedno s uklanjanjem ACTH (57). Gubitak stanica odvijao se usporedno s morfološkim promjenama stanice u smislu apoptoze, pa je smrt tih stanica bila dokaz da su one hormonski ovisne. Karakteristično je da su apoptotska tjelešca bila smještena u unutrašnjim dijelovima kore nadbubrežne žlijezde. Kontrolna skupina životinja koja je dobivala ACTH imala je vrlo malo apoptotskih tjelešaca (57).

Utjecaj ACTH na broj stanica u nadbubrežnoj žlijezdi potvrđen je i otkrićem brojnim receptora za ACTH u zoni retikularis nekih sisavaca, gdje je smanjena mitotska aktivnost pri nižoj koncentraciji ACTH (57). To dovodi do zaključka da je taj proces ovisan o djelovanju ACTH tijekom sinteze DNK, a poznato je da ACTH stimulira sintezu g RNK proteina (58). Iz toga se također može zaključiti da i ostali hormoni koji sudjeluju u prepisivanju DNK mogu dovesti do reverzibilnog prekida nekih funkcija citoplazme (57).

Na temelju iznesenih primjera može se objasniti kako tkiva koja funkcionalno ovise o specifičnoj hormonskoj stimulaciji nakon pada trofičkog hormona dolaze u stanje involucije, odnosno atrofije. Eksperimentalni rad koji je potvrdio tu pretpostavku bio je pokus s kastriranim štakorima. Naime, nakon obostrane orhiektomije uočena je atrofija prednjeg režnja prostate, histološki karakterizirana pojavom brojnih apoptotskih tjelešaca u lumeni žlijezda koja su

imala eozinofilnu citoplazmu s bazofilnim fragmentima jezgre i morfološki intaktnim organelima (59).

Proces involucije prostate koji nastaje oduzimanjem androgena nije sasvim razjašnjen. Ispitivanje je rađeno na prostati štakora u različitim vremenskim razmacima nakon kastriranja uporabom 3H-timidina autoradiografskom metodom. Rezultati su obrađeni morfometrijski, a gubitak stanica bio je određen proporcijom apoptotskih tjelešaca. Nađeno je da je apoptotski indeks najveći 2. dan u žlijezdama, a u ostalim dijelovima prostate između 4. i 8. dana nakon kastracije. Istraživanje je pokazalo da je određivanje apoptotskog indeksa vrlo pouzdan parametar koji pokazuje hormonsku ovisnost regresije prostate (60). Dokazano je da nakon kastracije dolazi do gubitka epitelnih stanica prostate ali ne i stromalnih. Prema Denmeadu i sur. fibroblastni čimbenik rasta (FGF-7) koji nastaje u stromalnim stanicama, sekundarno stimulira epitelne stanice prostate nakon kastracije (61).

Stanične promjene koje se događaju kod bubrežne atrofije zbog hidronefroze nisu za sada dovoljno objašnjene s obzirom na njihovu učestalu pojavu i medicinsku važnost. Nakon nastanka opstrukcije uretera u parenhimu bubrega nastaju: atrofija tubula, intersticijska fibroza, intersticijska upala, gubitak bubrežnog tkiva, dok glomeruli ili krvne žile ne pokazuju značajnijih oštećenja (62, 63). Uočeno je da urinarna opstrukcija potiče apoptozu kako stanica bubrežnih tubula, tako i intersticija. Patogenetska važnost toga procesa je u tome što je apoptoza tubularnih stanica vjerojatno glavni faktor odgovoran za progresivni gubitak bubrežnog tkiva u bubrezima s kroničnom opstrukcijskom uropatijom, a apoptoza intersticijskih stanica je odgovorna za oštećenje bubrežnog intersticija kod kronične opstrukcijske uropatije (64). Kod bubrega s podvezanim jednim ureterom dokazan je progresivni gubitak tkiva kao posljedica apoptotskih promjena u tolikoj mjeri da je težina bubrega nakon 15 dana opstrukcije smanjena na otprilike 60% od kontrolne (65).

L I T E R A T U R A

1. Mooney A, Jobson T, Bacon R, Kitamura M, Savill J. Cytokines promote glomerular mesangial cell survival in vitro by stimulus-dependent inhibition of apoptosis. *J Immunol* 1997; 159: 3949–60.
2. Mooney A, Jackson K, Bacon R, Streuli G, Edwards J, Bassuk J. Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. *Am J Pathol* 1999; 155: 599–606.
3. Bailey RW, Aronow B, Harmony JAK, Griswold MD. Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of cluterin/ApoJ knock-out mice. *Biol Repro* 2002; 66(4): 1042–53.
4. Cahuzac N, Baum W, Kirkin V i sur. Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity. *Blood* 2006; 107(6): 2384–91.
5. Ortiz A, Lorz C, Egidio J. New kids in the block: the role of FasL and Fas in kidney damage. *J Nephrol* 1999; 12: 150–8.
6. Lorz C, Ortiz A, Justo P, Gonzales-Cuadrado S, Duque N, Gomez-Guerrero C, Egido J. Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1266–77.
7. Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999; 55: 2322–37.
8. Justo P, Sanz AB, Lorz C, Egido J, Ortiz A. Lethal activity of FADD death domain in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2006; 69: 2205–11.
9. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245–54.
10. Jabbour AM, Puryer MA, Yu JY i sur. Human Bcl-2 cannot directly inhibit the *Caenorhabditis elegans* Apaf-1 homologue CED-3, but can interact with EGL-1. *J Cell Sci* 2006; 119: 2572–82.
11. Wagener A, Blottner S, Gortiz F, Streich WJ, Fickel J. Differential changes in expression of a and b FGF, IGF-1 and -2, and TGF-alpha during seasonal growth and involution of roe deer testis. *Growth Factors* 2003; 21: 95–102.
12. Lorz C, Justo P, Sanz AB, Egido J, Ortiz A. Role of Bcl-xL in paracetamol-induced tubular epithelial cell death. *Kidney Int* 2005; 67: 592–601.
13. Pothana S, Dong Z, Valery M. Apoptosis: Definition, mechanisms and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107: 489–506.
14. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
15. Wyllie AH. Apoptosis. *Br Med Bull* 1997; 53: 478–80.
16. Wang SH, Van Antwerp M, Kuick R i sur. Microarray analysis of cytokine activation of apoptosis pathways in the thyroid. *Endocrinology* 2007; 148: 4844–52.
17. Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Goke R. Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis* 2005; 10: 611–17.
18. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269–90.
19. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355–65.
20. Djerbi M, Malinowski MM, Yagita H, Zhivotovsky B, Grandien A. Participation of FLIP, RIP and Bcl-x(L) in fas-mediated T-cell death. *Scand J Immunol* 2007; 66(4): 410–21.
21. Takashina T, Nakayama M. Revival of apoptotic cells that display early-stage dynamic membrane blebbing. *FEBS Lett* 2007; 581: 4479–84.
22. Muzio M, Stockwell BR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 2926–30.
23. Tergaonkar V. NF kappa B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1647–53.
24. Gamulin S. Poremećaji genskog izražaja. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2002, 68–69.

25. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6910–24.
26. Deveaux QL, Reed JC. IAP-family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239–52.
27. Stuart M, Flechner JHF, Fairchild RL. Apoptosis—programmed cell death. U: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ. *Campbell's Urology*. 8. ed. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: Saunders, 2002, 325–7.
28. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147–57.
29. Nakabayashi J, Sasaki A. A mathematical model for apoptosome assembly: The optimal cytochrome c/Apaf-1 ratio. *J Theor Biol* 2006; 242: 280–87.
30. Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem* 2005; 137(2): 125–32.
31. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 561–86.
32. Mikolajczyk J, Scott FL, Krajewski S, Sutherlin DP, Salvesen GS. Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry* 2004; 43: 10560–9.
33. Seshagiri S, Miller L. *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3 induced apoptosis. *Curr Biol* 1997; 7: 455–60.
34. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549–56.
35. Franklin EE, Robertson JD. Requirement of Apaf-1 for mitochondrial events and the cleavage or activation of all procaspases during genotoxic stress-induced apoptosis. *Biochem J* 2007; 405: 115–22.
36. Kim R, Emi M, Tanabe K. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncol Rep* 2005; 14: 595–99.
37. Chuang Y-H, Chuang W-L, Huang S-P, Huang C-H. Release of cytochrome-c and activation of caspases related to myocyte apoptosis in obstructed ureters in a rat model of obstructive uropathy. *BJU International* 2003; 32: 113–118.
38. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome-c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481–90.
39. Kuwana T, Smith JJ, Muzio M i sur. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome-c. *J Biol Chem* 1998; 273: 16589–94.
40. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacher PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91: 627–37.
41. Conradt B, Horvitz RH. The *C. elegans* protein egl-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998; 93: 519–29.
42. Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 545–53.
43. Garland JM, Rudin C. Cytochrome c induces caspase-dependent apoptosis in intact hematopoietic cells and overrides apoptosis suppression mediated by bcl-2, growth factor signalling MAP-kinase and malignant change. *Blood* 1998; 92: 1235–46.
44. Husari AW, Dbairo GS, Bitar H i sur. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia. *Respir Res* 2006; 7: 100.
45. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decision. *Mol Immunol* 2003; 39: 615–47.
46. Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 2006; 28: 253–60.
47. Walensky LD. Bcl-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1339–50.
48. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1423–33.
49. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33–42.
50. Narita M, Shimizu S, Ho T i sur. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14681–86.
51. Challa M, Malladi S, Pellock BJ i sur. *Drosophila* Omi, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease. *Embo J* 2007; 26: 3144–56.
52. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914–25.
53. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300–4.
54. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; 17: 2215–23.
55. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibition of apoptosis c-IAP-2 is under NF- κ B control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10057–62.
56. Kovač Z. Smrt stanice. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. *Patofiziologija*. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2002., 123–128.
57. Radović N. Učinak inhibitora angiotenzina II na fibrozu i apoptozu te aktivnost kaspaze-3 u bubrezima nakon podvezivanja uretera u štakora. Disertacija. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2005, 40.
58. Nussdorfer G, Mazzocchi G, Rebonto L. Long-term trophic effect of ACTH on rat adrenocortical cells. An ultrastructural, morphometric and autoradiographic study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1981; 115: 30–40.
59. Kerr JFR, Searle J. Deletion to Cells by Apoptosis during Castration-Induced Involution of the Rat Prostate. *Virchows Arch Abt B Zell Path* 1973; 13: 87–102.
60. Stiens R, Helpap B. Die Regression der Ratten-Prostata nach Kastration: Histologische morphometrische und Zellkinetische Untersuchung unter Berücksichtigung der Apoptose. *Pathol Res Pract* 1981; 172: 73–87.

61. Denmeade SR, Linx Xs, Isaacs JT Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996; 28: 251–65.

62. Klahr S. Obstructive nephropathy. *Intern Med* 2000; 39: 355–61.

63. Truong LD, Sheikh–Hamad D, Chakraborty S, Suku WN. Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy. *Semin Nephrol* 1998; 18: 641–651.

64. Truong LD, Petrussevska G, Yang G i sur. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int* 1996; 50: 200–7.

65. Truong LD, Yeon–Jin C, Chun Chui T i sur. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: The roles of caspases. *Kidney Int* 2001; 60: 924–34.

S U M M A R Y

MOLECULAR ASPECTS OF APOPTOSIS

N. RADOVIĆ, S. ČUŽIĆ¹ and S. ALTARAC²

Department of Urology, Dubrava University Hospital, ¹Department of Pharmacology and Drug Safety, Pliva, Zagreb and ²Department of Urology, Zabok General Hospital, Zagreb, Croatia

Corresponding to its importance in cell count homeostasis in the body, apoptosis is a tightly regulated phenomenon. Both extracellular and intracellular molecules provide multiple regulatory and counter–regulatory pathways. Cell death is usually a response to the cell microenvironment, where the absence of certain factors (survival factors) or the presence of lethal factors promotes apoptosis. Surrounding cells, soluble mediators and the extracellular matrix regulate cell death and survival. Surrounding cells can synthesize survival or lethal factors. The intracellular regulation of apoptosis is also one of the forefront fields in biomedicine research. During the past five years, tremendous progress has been made in understanding apoptosis as a result of molecular identification of the key components of this intracellular suicide program. Biochemical activation of these key components of the cell death program is responsible for the morphological changes observed in apoptosis, including mitochondrial damage, nuclear membrane breakdown, DNA fragmentation, chromatin condensation and the formation of apoptotic bodies. Caspase activation plays a central role in the execution of apoptosis. Most caspases are constitutively expressed as inactive proenzymes (procaspases) in the cytosol and according to some reports in the mitochondria. Caspases are sequentially activated by proteolysis during apoptosis. In this review, we focus on the biochemical pathways that control caspase activation, particularly the activation pathways that are initiated by cell surface death receptors and mitochondria.

Key words: cell death, apoptosis, caspase, cell surface death receptor, mitochondria