

VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY

ROČNÍK LXIX

ŘÍJEN 2000

ČÍSLO 5

576.36:616

MECHANISMY ROZVOJE APOPTÓZY A MOŽNOSTI JEJÍHO VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

¹Jan ÖSTERREICHER, ²Viktor MEINEKE, ¹Aleš MACELA, ²Dirk van BEUNINGEN

¹Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

²Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, Bundesrepublik Deutschland

Souhrn

Apoptóza, na rozdíl od nekrózy, je specifickým fenoménem konce buněčného života. Tato práce předkládá současné poznatky o vzniku a mechanismech apoptózy, nově navrhované dělení apoptózy podle vzniku a uvažované mechanismy procesu. Dále jsou zevrubně popsány charakteristiky ireverzibility apoptózy. Z níže uvedených mechanismů pak vyplývají možnosti detekce apoptózy. Nakonec jsou zde prezentovány možnosti využití apoptózy v klinické praxi.

Klíčová slova: Apoptóza; Mechanismy; Detekce; Klinická praxe.

Mechanisms of Apoptosis Development and Possibilities of Its Use in Clinical Practice

Summary

Apoptosis, contrary to necrosis, is a specific phenomenon at the end of a cell-life. This paper presents current knowledge about apoptosis development and mechanisms, a new categorisation of apoptosis by time and by type of its development mechanisms. Next, two points of no return for the apoptotic process as well as the possibilities of detection in experimental work are described. Finally, possibilities for the use of apoptosis in clinical practice are mentioned.

Key words: Apoptosis; Mechanisms; Detection; Clinical practice.

Současný pohled na vznik apoptózy

Apoptóza je „černou dírou“ buněčné smrti, která pohltí cokoli, a nic neunikne skrz její biochemický horizont.

Jsou známy dva druhy buněčné smrti - apoptóza a nekróza. Apoptóza je v protikladu k nekróze organizovaným a „naprogramovaným“ druhem buněčné smrti, který se vyskytuje v průběhu organogeneze, po působení škodlivých zevních vlivů apod. Pokud takový zevní vliv nezpůsobí nekrózu buňky a bu-

něčné kompartmenty jsou natolik poškozeny, že jejich reparace přesahuje možnosti opravných mechanismů, je spuštěna kaskáda mechanismů, kterou nazýváme apoptóza. Termín apoptóza původně pouze popisoval morfologické změny, ke kterým v daném případě dochází (14).

V průběhu apoptózy se buňka fragmentuje, cytoplazma se „drobí“ do jednotlivých vakuol, endoplazmatické retikulum se vakuolizuje, chromatin je štěpen a kondenzován podél jaderné membrány. V konečném stadiu se jádro a zbytek buňky formují

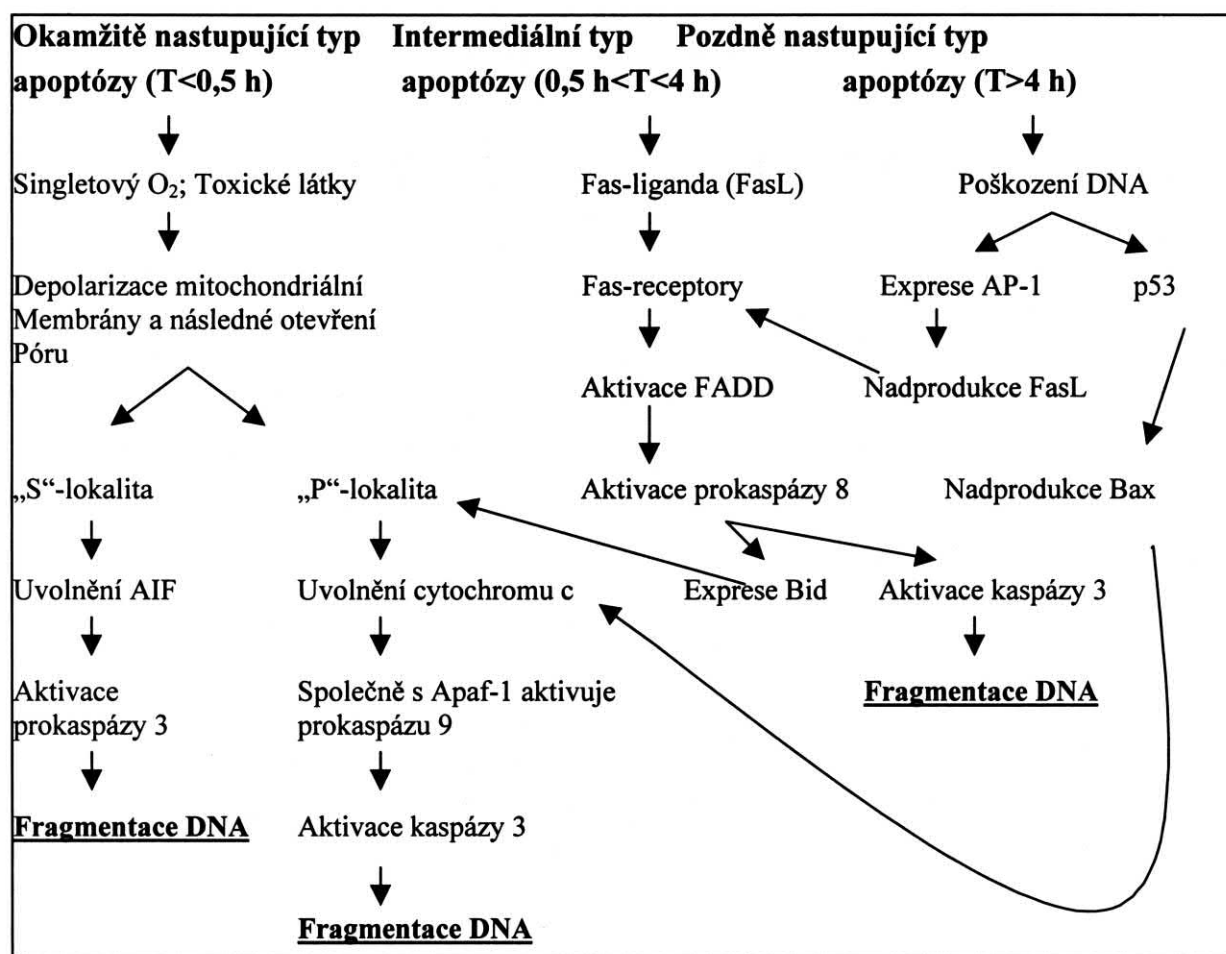


Schéma 1: Rozdělení mechanismů vzniku apoptózy podle D. E. Godarové (6)

do malých kompaktních částic zvaných apoptotická tělíska. Poté mohou být tato apoptotická tělíska pohlcena „neprofesionálními“ fagocyty, v případě plicní tkáně jsou to pneumocyty II. typu. Pokud nemohou být apoptotická tělíska fagocytována, podléhají tzv. sekundární nekróze. Během sekundární nekrózy vznikají ruptury lyzozomů s následným uvolněním hydrolytických enzymů do cytoplazmy způsobujících další destrukci interních komponent apoptotického tělíska včetně plazmatické membrány samotné. Při snížení integrity plazmatické membrány jsou hydrolytické enzymy uvolňovány do mezibuněčného prostředí, kde mohou vyvolat i závažnou odpověď s následným poškozením okolní tkáně.

Původně popisný název nezahrnoval biochemické pochody, protože v čase definování tohoto termínu nebyly známy (14).

Dianne E. Godarová (6) z americké FDA navrhla model dělení apoptózy podle kinetiky vzniku na 3 typy - okamžitý, intermediální a opožděný.

1. Okamžitě nastupující apoptóza vzniká do 30 min po začátku působení stimulu. Jedná se zejména o singletový kyslík a zevní vlivy generující vznik nových superoxidových radikálů, jako jsou UVA1 záření, ionizující záření a další. Tento okamžitě nastupující druh apoptózy nevyžaduje žádnou produkci proteinů mezi dobou působení zevního stimulu a aktivací apoptózy samotné. To proto, že uvedené kyslíkové radikály okamžitě depolarizují mitochondriální transmembránový potenciál a uvolní látky s proapoptotickou aktivitou (12, 34). Z práce Godarové vyplývá (7), že při aktivaci okamžitě nastupující formy apoptózy jsou aktivovány i mechanismy ostatních forem tohoto druhu buněčné smrti, tj. intermediální a opožděně nastupující formy apoptózy.
2. Intermediální typ apoptózy vzniká po aktivaci membránového Fas (CD95/APO-1) receptoru. Tato forma apoptózy byla popsána po působení stimulů generujících superoxidové anionty nebo hydroxylové radikály (1, 3, 7, 22, 29). Aktivace

Fas-receptoru způsobí následně prostřednictvím Fas přidružené smrtící domény (Fas Associate Death Domain - FADD) aktivaci prokaspázy 8. Efekt Fas-ligandy navíc přes aktivaci proteinů AP-1 a NF- κ B podněcuje tvorbu dalších ligandů pro Fas-receptor (13). Jsou popisovány 2 mechanismy účinku kaspázy 8. Tento enzym buďto přímo natráví efektorovou kaspázu 3 (33), nebo štěpí Bid-protein, stavební protein mitochondriálních pórů, což vede k uvolnění proapoptotických stimulů a definitivnímu spuštění apoptotického procesu v časovém horizontu mezi 30 minutami a 4 hodinami po začátku působení proapoptotického stimulu.

3. Poslední typ apoptózy, opožděně vznikající apoptóza, je spouštěna na podkladě poškození DNA za více než 4 hodiny po působení zevního stimulu, jako jsou i ionizující a ultrafialové záření A, B i C (7, 8, 11, 19, 28). Po poškození DNA jsou vytvářeny transkripční faktory, zejména AP-1 a p53 (13, 16, 37). Protein AP-1 se v buněčném jádře váže na Fas-ligandový promotor, který aktivuje expresi samotné Fas-ligandy, která výše popsanou cestou (viz intermediální typ apoptózy) aktivuje Fas-receptor (13). Na druhé straně, akumulace p53 vede ke zvýšené expresi proapoptotického Bax-proteinu (26, 30, 32). Bax-protein může následně otevírat póry v mitochondriální membráně, což vede k okamžitému uvolnění proapoptotických faktorů popsaných u okamžité nastupující formy apoptózy (7, 12).

Stadia rozhodující ireverzibilitu procesu apoptózy

Existují dvě stadia apoptózy, která pokud proběhnou, stává se proces buněčné smrti neodvratným. Prvním z nich je otevření mitochondriálního kanálu, megapóru, v „S“-lokalitě (18), druhým mechanismem je otevření megapóru v tzv. P-místě mitochondriálního kanálu - megapóru (12, 20). Takzvané S-místo bylo pojmenováno podle funkčních vlastností, tj. je senzitivní na hladinu redukováných sulfhydrlů, lokalita „P“ je inhibována zvýšenou hladinou redukováných pyrimidinových nukleotidů, např. NADH.

Na zevní straně mitochondriálního megapóru jsou lokalizovány benzodiazepinový receptor a protoporphyrin IX, který je jeho ligandou. Dále jsou to hexokináza, bcl-2, Bax, Bag-1 a F₁-ATPáza (23).

Na vnitřní straně megapóru se nachází Cyclophilin D, apoptózu indukující faktor (AIF) (18, 34), cytochrom c a mnoho dalších (7).

Pokud je megapór otevřen v „S“-místě, okamžitě poklesne transmembránový potenciál a dojde k uvolnění AIF do cytoplazmy (18, 34).

Zevní vlivy způsobující produkci singletového kyslíku mohou okamžitě depolarizovat mitochondriální transmembránový potenciál, a způsobit tak uvolnění AIF skrz otevřenou „S“-lokalitu mitochondriálního megapóru (7).

Druhým bodem, odkud není pro buňku návratu, je otevření mitochondriálního megapóru v „P“-lokalitě, což může být způsobeno přímým účinkem Bax nebo Bid-proteinů. Posléze dojde k translokaci cytochromu c do cytoplazmy (12, 20). Také superoxidové radikály, vzniklé na podkladě interakce tkáně se zářením, mohou otevřít megapór v „P“-lokalitě (7). Dalším mechanismem otevření mitochondriálního megapóru v „P“-lokalitě je aplikace etanolu, jehož proapoptotický efekt je již popsán (4, 21, 24, 25). Etanol nejen zvyšuje expresi TNF- α (4), ale oxidující alkohol dehydrogenáza zvyšuje nízký pool pyrimidinových nukleotidů, které regulují funkční stav „P“-lokality a jejichž vysoká koncentrace může „P“-místo otevřít (7).

Inhibice vůči otevření megapóru v obou zmíněných lokalitách byla popsána u bcl-2 a bcl-X_L proteinů (17, 23, 35).

Skrz „S“-lokalitu mitochondriálního megapóru uvolněný AIF štěpí prokaspázu 3 na aktivní kaspázu 3, která je efektozem apoptotického procesu (18, 23, 35).

Přes „P“-lokalitu megapóru translokovaný cytochrom c asociuje s Apaf-1 a aktivuje prokaspázu 9 na aktivní formu. Aktivovaná kaspáza 9 pak spouští kaskádu enzymatických aktivací zahrnujících i aktivaci kaspázy 3 a eventuálně potencují tento proces naštěpením bcl-2, což následně způsobí mitochondriální transmembránovou depolarizaci (10).

Lze tedy shrnout, že je-li jednou uvolněn AIF v „S“-lokalitě nebo cytochrom c v „P“-místě a dojde-li k jejich přenosu do cytoplazmy, apoptotický proces se stává nezvratným (6).

Využití mechanismů apoptózy k detekci apoptotických buněk

Biochemické pochody, ke kterým v průběhu apoptózy dochází, jsou nyní využívány k určování

a kvantifikaci apoptotických buněk. Například při stanovení procenta výskytu apoptotických buněk použitím průtokového cytometru nebo mikroskopu jsou mnohdy hojně využívány typické charakteristiky apoptotických buněk, tj. jejich snížená velikost a zvýšená granularita (5). Apoptotické buňky také exprimují fosfatidylserinová rezidua na zevní straně buněčné membrány, na které se mohou navázat molekuly annexinu V.

Bylo zjištěno, že na průběhu aktivace apoptotického procesu se podílí specifické enzymy z rodiny cysteinových proteáz - kaspázy. Za úvodní aktivátor kaspázové kaskády je považována kaspáza 8, za efektorový enzym byla uznána kaspáza 3 (36). Detekce těchto specifických enzymů je také jednou z cest přímého určování apoptotických buněk. Kaspázy, podobně jako je tomu u připravované vojenské operace, strategicky „vystřihávají“, modifikují a destrukují životně důležité buněčné komponenty a molekuly, jako jsou jaderná membrána, bcl-2, s retinoblastomem asociovaný protein (Rb protein), fokální adhezivní kinázy, p21-aktivovaná kináza 2, proteinkináza C-gama, protein fosfatáza 2A, poly(ADP-ribóza) polymeráza (PARP), fodrin, gelsolin a mnoho dalších (6, 7, 36). Jejich aktivace nebo následný destruktivní účinek může být velmi dobře detekovatelný pomocí Western blotů.

Jedním z účinků kaspáz je štěpení inhibitorů apoptózy a/nebo aktivace endogenních endonukleáz, které následně štěpí jadernou DNA. První endonukleáza štěpí DNA na úseky o velikosti 50-300 kilobází a druhá pak na úseky o velikosti asi 180 kilobází, což může být přehledně demonstrováno „žebříkovitým“ obrazem na elektroforetických gelech. Lze také vázat značené nukleotidy na 3' koncích každého štěpu DNA pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy (TUNEL), čehož bylo hojně využíváno k vizualizaci apoptotických buněk na tkáňových řezech. Pro obtížnou a nákladnou metodiku provádění tohoto barvení jsou však hledány i jiné cesty. Jednou z nich je imunohistochemická detekce specifického fragmentu vzniklého při štěpení cytokeratinu 18 kaspázou 3, která je však použitelná pouze pro epiteliální (cytokeratin 18 pozitivní) buňky a tkáně (27).

Klinické využití apoptózy

Apoptóza je perspektivním fenoménem také z léčebného hlediska. V případě proveditelné řízené

apoptózy (ať už její aktivace, nebo inhibice) by bylo možné příznivě ovlivnit růst karcinomů (aktivací apoptózy nádorových buněk) (6) nebo uchránit dočasně tkáně před deepitelizací či snížením počtu funkčních buněk po intoxikacích, po ozáření, v průběhu zánětlivých procesů aj. prostřednictvím inhibice apoptózy. Z tohoto hlediska lze apoptózu považovat za jev, který by mohl být novým přínosem pro léčbu mnoha klinicko-patologických jednotek, které doposud nemůžeme ovlivnit nebo můžeme jejich průběh modifikovat jen částečně.

Experimentální studie již nyní poskytují dostatečné spektrum látek, které je možné použít v brzké době v *in vivo* experimentech a následně i v klinických studiích.

Z hlediska okamžitého spuštění apoptotického procesu je perspektivní použití nordihydroguaiaretové kyseliny (NDGA), která *in vitro* způsobuje depolarizaci mitochondriálních membrán a následně spuštění apoptotického procesu 4 hodiny po podání, přičemž aplikace N-acetylcysteinu před použitím NDGA velmi významně blokuje proapoptotické účinky nordihydroguaiaretové kyseliny (2).

Také efekt a interakce 4-aminopyridinu (4-AP), blokátoru draslíkového kanálu, vyžadují další zkoumání. 4-AP svým působením zvyšuje intracelulární koncentraci vápenatých a hořčkových iontů a napomáhá depolarizovat membrány. Účinky 4-AP byly signifikantně utlumeny podáním flufenamové kyseliny (neselektivního blokátoru kationtových kanálů) nebo aplikací BAPTA (intracelulárního vápenatého chelátoru), které inhibují proapoptotické účinky 4-aminopyridinu (15).

In vitro metodami byly popsány i látky se specifickým proapoptotickým účinkem pouze proti buňkám nádorových linií, jako jsou alkylované lyzofosfolipidy. Tato skupina látek má proapoptotické účinky proti buňkám leukemických linií, nikoli proti normálním endoteliálním buňkám (30). Autoři se domnívají, že tato třída látek inhibuje mitogeny aktivovanou proteinkinázu (MAPK) s antiapoptotickým efektem, a naopak stimuluje stresem aktivovanou proteinkinázu/c-Jun NH₂-terminální kinázu (SAPK/JNK), a tudíž i biochemickou cestu nezbytnou pro vyvolání apoptózy.

Na druhé straně byla zjištěna existence látek s významným antiapoptotickým účinkem. Z výsledků *in vitro* experimentu s polypeptidem z-Ala-Ala-Asp-cmk (AAD) a tosyl-lysin chloromethyl ketonem (TLCK) vyplývá specifický inhibiční účinek proti aktivaci kaspáz a v případě TLCK i inhibice

produkce p53 a následné zabránění nadprodukci Bax-proteinu (9), který je schopen vyvolat apoptotický proces (12).

Literatura

- ARAGANE, Y. - KULMS, D. - METZE, D., et al.: Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD 95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.*, 1998, vol. 140, p. 171-182.
- BISWAL, SS. - DATTA, K. - SHAW, SD., et al.: Glutathione oxidation and mitochondrial depolarization as mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in lipoxygenase-deficient FL5.12 cells. *Toxicol. Sci.*, 2000, vol. 53, p. 77-83.
- BOSSY-WETZEL, E. - NEWMAYER, DD. - GREEN, DR.: Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO*, 1998, vol. 17, p. 37-49.
- DIEHL, AM.: Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin. Biochem.*, 1999, vol. 32, p. 571-578.
- DIVE, C. - GREGORY, CD. - PHIPPS, DJ., et al.: Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, vol. 133, p. 275-285.
- GODAR, DE.: Light and death. *J. Invest. Dermatol. (Symposium Proceedings)*, 1999, vol. 4, p. 17-23.
- GODAR, DE.: UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, vol. 112, p. 101-111.
- GODAR, DE. - LUCAS, AD.: Spectral dependence of UV-induced immediate and delayed apoptosis: the role of membrane and DNA damage. *Photochem. Photobiol.*, 1995, vol. 62, p. 108-113.
- GONG, B. - CHEN, Q. - ENDLICH, B., et al.: Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth Differ.*, 1999, vol. 10, p. 491-502.
- CHENG, EHY. - KIRSCH, DG. - CLEM, JR., et al.: Conversion of bcl-2 to Bax like death effector by caspases. *Science*, 1997, vol. 278, p. 1966-1968.
- JONES, CA. - HUBERMAN, E. - CUNNINGHAM, ML., et al.: Mutagenesis and cytotoxicity in human epithelial cells by far- and near-ultraviolet radiation: action spectra. *Radiat. Res.*, 1987, vol. 110, p. 244-254.
- JURGENSMAIER, JM. - XIE, Z., et al.: Bax directly induces of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, p. 4997-5002.
- KASIBHATLA, S. - BRUNNER, T. - GENESTIER, L., et al.: DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and Ap-1. *Mol. Cell.*, 1998, vol. 1, p. 543-551.
- KERR, JFR. - WYLLIE, AH. - CURRIE, AR.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, vol. 26, p. 239-257.
- KIM, J. - KANG, YS. - JUNG, M., et al.: Ca(2+) Influx Mediates Apoptosis Induced by 4-Aminopyridine, a K(+) Channel Blocker, in HepG2 Human Hepatoblastoma Cells. *Pharmacology*, 2000, vol. 60, p. 74-81.
- KIMURA, C. - ZHAO, QL. - KONDO, T., et al.: Mechanism of UV-induced apoptosis in human leukemia cells: role of Ca2+/Mg2+ - dependent endonuclease, caspase-3 and stress-activated protein kinases. *Exp. Cell Res.*, 1998, vol. 239, p. 411-422.
- KLUCK, RM. - BOSSY-WETZEL, E. - GREEN, DR., et al.: Release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997, vol. 275, p. 1132-1136.
- KROEMER, G. - ZAMZAMI, N. - SUSIN, SA.: Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, 1997, vol. 18, p. 44-51.
- LEY, RD. - APPELEGATE, LA.: Ultraviolet radiation-induced histopathological changes in the skin of the marsupial *Monodelphis domestica*. II. Quantitative studies of the photoreactivation of induced hyperplasia and sunburn cell formation. *J. Invest. Dermatol.*, 1985, vol. 85, p. 365-367.
- LI, H. - ZHU, H. - XU, CJ., et al.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, vol. 94, p. 491-501.
- MAREKOVÁ, M. - VÁVROVÁ, J. - VOKURKOVÁ, D.: Apoptosis in human HL-60 cells induced by ethanol. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2000, in press.
- MARTIN, SJ. - NEWMAYER, DD. - MATHIAS, S., et al.: Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide - induced apoptosis. *EMBO*, 1995, vol. 14, p. 5191-5200.
- MARZO, I. - BRENNER, C. - ZAMZAMI, N., et al.: The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2 related proteins. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, p. 1261-1271.
- MORITA, A. - WERFEL, T. - STEGE, H., et al.: Evidence that singlet oxygen-induced human T-helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, p. 1763-1768.
- NEUMAN, MG. - SHEAR, NH. - CAMERON, RG., et al.: Ethanol-induced apoptosis in vitro. *Clin. Biochem.*, 1999; 32: 547-555.
- O'GRADY, A. - KAY, EW. - McKENNA, DB., et al.: Altered expression of the p53-regulated proteins, p21Waf/Cap1, MDM2, and Bax in ultraviolet-irradiated human skin. *Hum. Pathol.*, 1998, vol. 29, p. 559-564.
- ÖSTERREICHER, J. - KRÁLIK, M. - NAVRÁTIL, L., et al.: The apoptosis and bcl-2 expression in the irradiated lungs and their influencing by Pentoxifylline. *European Radiation Research 2000, 27th-31st, August 2000, Warszawa*.
- PEAK, JG. - PEAK - MJ.: Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strands breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. *Mutat. Res.*, 1991, vol. 246, p. 187-191.
- REHEMTULLA, A. - HAMILTON, CA. - CHINNAIYAN, AM., et al.: Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, p. 25783-25786.
- REINKE, V. - LOZANO, G.: Differential activation of p53 targets in cell treated with ultraviolet radiation that

- undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiat. Res.*, 1997, vol. 148, p. 115-122.
31. RUITER, GA. - ZERP, SF. - BARTELINK, H., et al.: Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, p. 2457-2463.
32. SELVAKUMARAN, M. - LIN, KH. - MIYASHITA, T., et al.: Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF- β 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, 1994, vol. 9, p. 1791-1798.
33. STENNICKE, HR. - JURGENSMEIER, JM. - SHIN, H., et al.: Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, p. 27084-27090.
34. SUSIN, SA. - LORENZO, HK. - ZAMZAMI, N., et al.: Molecular haracterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999, vol. 397, p. 441-446.
35. SUSIN, SA.N - ZAMZAMI, N. - CASTEDO, M., et al.: Bcl-2 inhibith the mitochondrial release of an apoptogenic protease, *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 184, p. 1331-1341.
36. THORNBERRY, NA. - LAZEBNIK, Y.: Caspases: enemies within. *Science*, 1998, vol. 281, p. 1312-1316.
37. WANG, Y. - ROSENSTEIN, B. - GOLDWYN, S., et al.: Differential regulation of p53 and bcl-2 expression by ultraviolet A and B. *J. Invest. Dermatol.*, 1998, vol. 111, p. 380-384.

Korespondence: Kpt. MUDr. Jan Österreicher, Ph.D.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové

Do redakce došlo 11. 2. 2000
