

آپوتوز، مرگ برنامه ریزی شده سلول

دکتر محمد هاشمی*، دکتر سعید قوامی*، دکتر فاطمه کرمی تهرانی**

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
** دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، آزمایشگاه بیوشیمی سرطان

۱- مقدمه

واژه آپوتوز برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محقق بنام کر^۱ جهت توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و تمایز آن از نکروز معرفی شد.^(۱) آپوتوز کلمه یونانی است و به معنی برگ ریزان می باشد. اغلب منابع دو واژه آپوتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلول را مترادف هم به کار برده، عده ای دیگر نیز آپوتوز را مهمترین نوع مرگ برنامه ریزی شده سلولی قلمداد کرده اند. این محققان مرگ برنامه ریزی شده سلولی را به صورت یک عنوان کلی جهت بیان و توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی به کار برده و آن را بر حسب عامل ایجاد کننده مرگ سلولی، مکانیسم عمل، تغییرات مورفولوژیک و بیوشیمیایی به دو نوع مرگ برنامه ریزی شده آپوتوزی^۲ و مرگ برنامه ریزی شده غیر آپوتوزی^۳ تقسیم بندی می نمایند.^(۲)

آپوتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول های T خود واکنش گر نقش دارد.^(۳) هرگونه اختلال در روند آپوتوز، منجر به بیماری می شود که می تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که منجر به ایجاد و رشد سلول های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می گردد. بالعکس افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی

در بیماری هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو و ایدز دیده می شود.^(۴) داروهای شیمی درمانی سبب القاء آپوتوز در سلول های سرطانی می شوند.^(۵-۷)

۲- آپوتوز و نکروز:

دو مکانیسم اصلی مرگ سلولی عبارتند از: آپوتوز و نکروز که این دو با هم تفاوت هایی دارند^(۸و۹) که می توان به شرح زیر خلاصه کرد:

- آپوتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است و در طی تحریکات خاصی اتفاق می افتد. در حالی که نکروز مرگ پاتولوژیک سلول بوده و در طی آسیب های شدید به سلول از قبیل هیپوکسی، هیپرترمی و سموم خارجی، این نوع مرگ سلولی اتفاق می افتد.
- نکروز فرایند غیر فعال است و در غیاب ATP نیز اتفاق می افتد در حالی که فرایند آپوتوز فعال بوده و به انرژی وابسته است.

- در فرایند آپوتوز سلول چروکیده و کوچک می شود در حالی که در نکروز سلول متورم و بزرگ می شود.

- در آپوتوز غشاء سیتوپلاسمی به صورت اجسام آپوتوتیک در می آیند، در حالی که در نکروز غشاء تخریب می شود و سبب آزاد شدن محتویات داخل سلولی می شود.

- ارگانل های سیتوپلاسمی در فرایند آپوتوز دست نخورده باقی می مانند، در حالی که در نکروز تخریب می شوند.

- تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن در روند آپوتوز مشاهده می گردد.

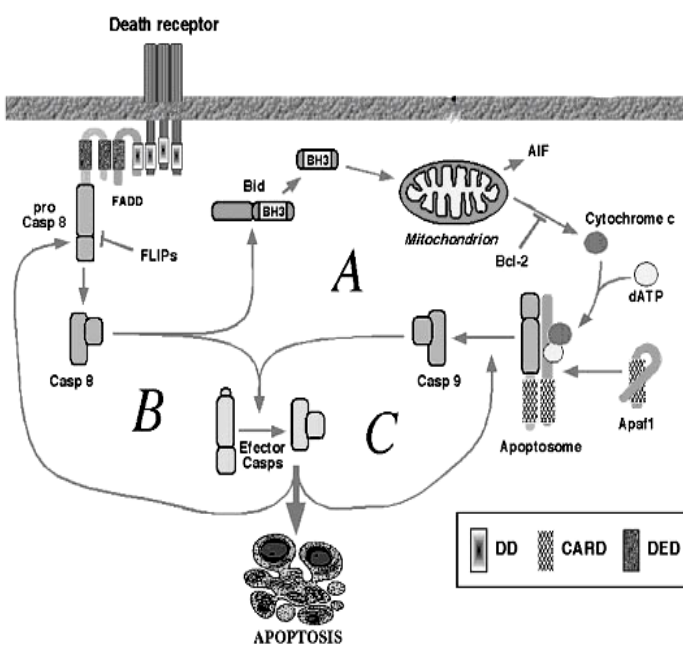
Kerr

apoptotic programmed cell death

non-apoptotic programmed cell death

پروکاسپاز)، "کمپلکس علامت دهندهٔ القاء مرگ" (DISC) گفته می‌شود. به این طریق پروکاسپاز-۸ به کاسپاز-۸ فعال تبدیل می‌شود.^(۱۱) کاسپاز-۸ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی شده و در نتیجه فرایند آپوپتوز صورت می‌گیرد. در تصویر ۱ به طور شماتیک مسیر خارجی آپوپتوز نشان داده شده است.

تصویر ۱- واکنش های آبخاری فعال شدن کاسپاز ها توسط گیرنده های مرگ (مسیر خارجی)^(۱۱).



۳-۲- مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز

میتوکندری هم در حیات و هم در مرگ سلولی دخالت دارد. این ارگانل انرژی رایج سلول را به فرم ATP فراهم می‌سازد. هوموستاز داخل سلولی را در ارتباط با یون ها و استرس های اکسیداتیو حفظ می نماید. در پاسخ به سیگنال های مرگ سلولی، نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری سبب آزاد شدن مولکول های پروآپوپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز^(۹) (AIF)، سیتوکروم c، Smac/DIABLO و اندونوکلئاز G از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل

در بافت وقوع نکروز همراه با واکنش های التهابی است، در حالی که آپوپتوز بدون التهاب رخ می‌دهد.

۳- مسیر های آپوپتوزی

۳-۱- مسیر خارجی یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده های مرگ

در غشاء پلاسمایی اغلب سلول ها گیرنده های مرگ وجود دارد. گیرنده های مرگ، اعضاء ابرخانوادهٔ گیرندهٔ فاکتور نکروز دهندهٔ تومور^(۴) (TNF) می باشند. زمانی که این گیرنده‌ها توسط لیگاند های مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می گردند. ویژگی این ابر خانواده وجود توالی غنی از سیستین در بخش خارج سلولی است. این گیرنده ها در بخش سیتوپلاسمی خود دارای توالی به نام ناحیه مرگ^۵ بوده و از این رو در انتقال پیام آپوپتوزی به درون سلول شرکت می نمایند. شناخته ترین گیرنده های مرگ عبارتند از:

CD95/Fas/Apo1, TNFR1, TNFR2, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2

تحریک گیرنده های مرگ توسط لیگاند های مربوط،

منجر به تریمریزاسیون گیرنده و به کارگیری پروتئین های آداپتور می گردد.^(۱۰) برای مثال لیگاند CD95 (CD95L) با گیرنده مربوط به خود (CD95R) میان کنش نموده و باعث القاء تریمریزاسیون آن می شود. این عمل باعث تشکیل خوشهٔ مرگ در ناحیه سیتوزولی گیرنده گردیده و باعث می شود که پروتئین های آداپتور از قبیل FADD/Mort1^۶ به آن متصل شود. FADD دارای ناحیه مرگ (DD) در C- ترمینال است که این پروتئین را قادر می سازد تا به گیرندهٔ تریمریزه شده از طریق میان کنش ناحیهٔ مرگ - ناحیهٔ مرگ متصل گردد. همچنین این پروتئین در ناحیهٔ N- ترمینال دارای "ناحیهٔ مؤثر مرگ"^(۷) (DED) می باشد که با ناحیهٔ DED مشابه در پرودمین کاسپاز-۸ میان کنش می کند. به این کمپلکس پروتئین ها (مجموعه لیگاند - گیرنده مرگ، ملکول آداپتور و

Tumor necrosis factor

Death domain (DD)

Fas-associated death domain

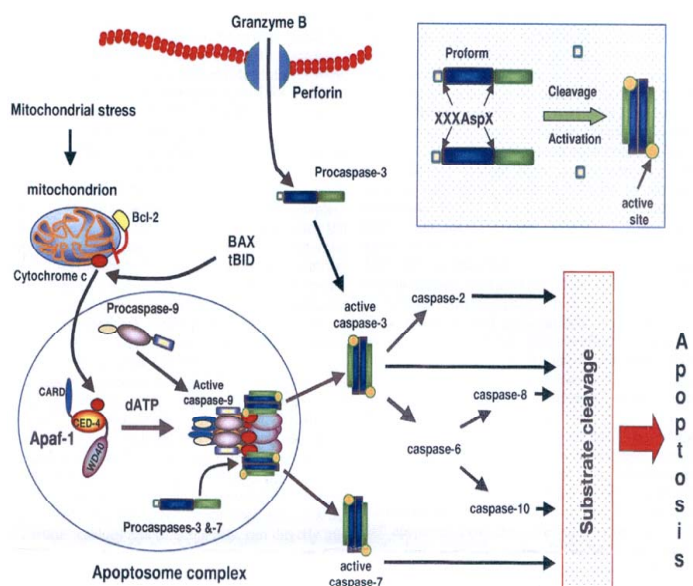
Death effector domain (DED)

Death-inducing signaling complex

Apoptosis inducing factor (AIF)

نشان می دهد. در مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی کاسپاز آغازگر کاسپاز-۹ می باشد. (۷-۵ و ۱۱ و ۱۴) کاسپاز-۹ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی (کاسپاز-۳ و ۶ و ۷) می گردد و تصویر-۲ واکنش های آبتشاری فعال شدن کاسپازها در مسیر میتوکندریایی (مسیر داخلی) و مسیر وابسته به

گرازیم B^(۱۱)



در نتیجه کاسپازهای اجرایی روی سوبستراهای خود عمل می نمایند و فرایند آپوپتوز صورت می گیرد. در برخی از رده های سلولی آپوپتوز غیر وابسته به کاسپاز-۳ به دنبال تیمار با ترکیبات مختلف صورت می گیرد. (۱۶ و ۱۷) در حالی که در اغلب رده های سلولی آپوپتوز وابسته به کاسپاز-۳ می باشد. (۱۶ و ۱۷-۱۴) لنفوسیت های T-سیتوتوکسیک و سلول های کشنده طبیعی (NK-cells) ممکن است مستقیماً از طریق "مسیر وابسته به رسپتور کاذب"^{۱۳} در سلول های هدف ایجاد آپوپتوز نمایند. در این حالت گرانول های محتوی گرازیم B^{۱۴} (GrB) که یک سرین پروتئاز است همراه با پرفورین تحویل غشاء پلاسمایی سلول های هدف داده می شود. پرفورین پروتئینی است که سبب ایجاد حفره در غشای پلاسمایی می شود

سیتوپلاسم می شوند. Smac/DIABLO اثر آنتاگونیستی روی مهار کنندگان کاسپاز دارد. (۱۲) فاکتور القاء کننده آپوپتوز (AIF) یک فلاوپروتئین ۵۷ کیلودالتونی است که در حالت طبیعی نقش آنتی اکسیدانی در میتوکندری به عهده دارد. بیان شده است که AIF آزاد شده از میتوکندری در طی روند آپوپتوز سبب آسیب به DNA هسته ای در مسیر مستقل از کاسپاز می شود. (۱۳) آزاد شدن سیتوکروم C به نظر می رسد که یک واقعه معمول در آپوپتوز است و مکانیسمی که آزاد شدن آن را کنترل می کند در دست بررسی است. مکانیسم های احتمالی عبارتند از باز شدن "منفذ انتقال نفوذپذیری"^{۱۰} میتوکندریایی، وجود کانال اختصاصی برای سیتوکروم C در غشاء خارجی میتوکندری و یا تورم و پاره شدن غشاء خارجی میتوکندری بدون از دست دادن پتانسیل غشایی.

Apaf-1 در حالت عادی در سلول به صورت بی اثر و غیر فعال حضور داشته و در پروسه آپوپتوز به سبب رهایی سیتوکروم C از میتوکندری فعال می گردد. وزن مولکولی این پروتئین ۱۳۰ کیلودالتون بوده و در ناحیه انتهای آمینی دارای دمین CARD و در انتهای کربوکسیلی دارای چندین بخش تکراری از موتیف WD-40 می باشد. برای فعال شدن پروتئین Apaf-1 ایجاد میان کنش بین این پروتئین و سیتوکروم C ضروری است. با مکانیسمی که به درستی مشخص نیست، سیتوکروم C و dATP/ATP باعث الیگومر شدن Apaf-1 می گردند. توالی CARD^{۱۱} پروکاسپاز-۹ با نسبت یک به یک به ناحیه CARD در Apaf-1 متصل گشته و سبب فعال شدن کاسپاز-۹ می شود و کاسپاز-۹ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی از قبیل کاسپاز-۳ و ۷ می شود. مجموعه پروتئین Apaf-1، سیتوکروم C و پروکاسپاز-۹ را آپوپتوزوم^{۱۲} می نامند. تصویر ۲ به طور شماتیک مسیر داخلی آپوپتوز را

Permeability transition pore

caspase recruitment domain (CARD)

Apoptosome

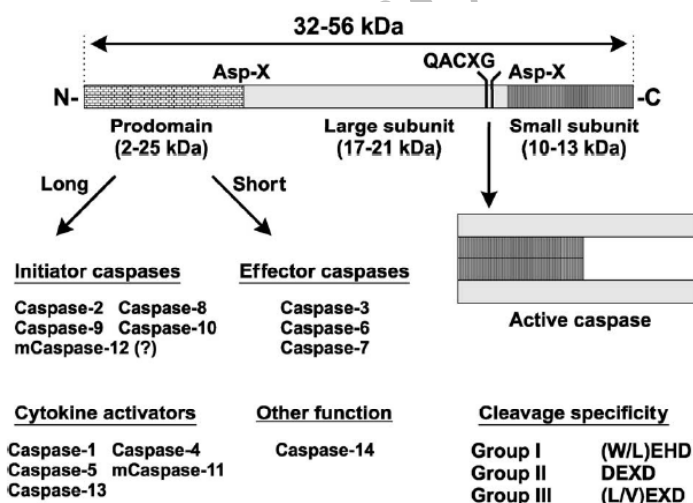
Pseudo-receptor-mediated pathway

Granzyme B (GrB)

شواهدی مبنی بر فعال شدن پی در پی کاسپازها در روند آپوپتوز، منجر به ارائه مسیر واکنش آبخاری برای کاسپازها گردید.^(۲۱ و ۲۲) این واکنش آبخاری با فعال شدن کاسپازهای آغازگر شروع شده و پیام را از طریق فعال کردن کاسپازهای اجرایی منتقل می‌نماید.^(۲۱ و ۲۲) پروکاسپازهای آغازگر (پروکاسپاز ۱۰، ۹، ۸، ۲، ۱۲) و همچنین کاسپازهای انتهایی (پروکاسپاز ۱۱، ۴، ۵، ۱۳) که عموماً در آپوپتوز دخالت ندارند، دارای پرودومین طویل هستند (بیش از ۱۰۰ اسید آمینه) در حالی که کاسپازهای اجرایی، دارای پرودومین کوتاه و معمولاً کمتر از ۲۰ اسید آمینه می‌باشند.^(۱۸)

کاسپازها را بر اساس ساختار، ویژگی نسبت به سوبسترا، فعالیت فیزیولوژیک و اندازه پرودومین پروکاسپاز، تقسیم بندی می‌نمایند. اما چیزی که در آپوپتوز بیشتر حائز اهمیت است تقسیم بندی کاسپازها به دو گروه کاسپازهای آغازگر (کاسپاز-۸، ۹، ۱۰ و ۱۲) با پرودومین طویل و کاسپازهای اجرایی (کاسپاز-۳، ۶ و ۷) با پرودومین کوتاه می‌باشند.^(۱۷) ساختار کاسپازها و چگونگی فعال شدن آن‌ها در تصویر ۳ به طور شماتیک نشان داده شده است.

تصویر ۳ - ساختار و چگونگی فعال شدن کاسپازها^(۱۷)



و اجازه می‌دهد که گرآنزیم B وارد سلول شده و واکنش آبخاری فعال شدن کاسپازها را به راه اندازد^(۱۱) که در تصویر ۲ نشان داده شده است.

۴- کاسپازها

کاسپازها^{۱۵} جزء خانواده سیستین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نمایند. به دنبال فعال شدن، این آنزیم‌ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک ایجاد می‌نمایند. از جمله چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و... بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپاز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است.^(۱۷)

خانواده کاسپازها در پستانداران دارای ۱۴ عضو است. این آنزیم‌ها به طور پیوسته در تمام سلول‌ها به صورت پروآنزیم (زیموژن) ساخته می‌شوند و در پاسخ به محرک‌های پروآپوپتوتیک فعال می‌شوند. پروکاسپاز دارای وزن ملکولی ۳۲ تا ۵۶ کیلو دالتون بوده و دارای ۴ دمین می‌باشد که عبارتند از پرودومین N - ترمینال، زیر واحد بزرگ (۱۷ تا ۲۱ کیلو دالتون)، زیر واحد کوچک (۱۰ تا ۱۳ کیلو دالتون) و یک ناحیه اتصالی کوتاه بین زیر واحد کوچک و بزرگ.^(۱۸) فعال شدن کاسپاز به دنبال پروتئولیز پروآنزیم در جایگاه ریشه آسپاراتات خاص بین دمین‌ها صورت می‌گیرد که منجر به حذف پرودومین و همچنین ناحیه اتصالی گردیده و منجر به تشکیل هترودیمیر، متشکل از یک زیر واحد کوچک و یک زیر واحد بزرگ می‌شود.^(۱۹) کاسپاز فعال تترامر بوده و از دو هترودیمیر تشکیل شده است. تمام کاسپازها دو مشخصه مهم مشترک دارند، یکی این که سیستین پروتئاز هستند و دارای توالی پنتاپپتیدی حفظ شده QACXG، حاوی جایگاه فعال سیستین می‌باشند.^(۲۰) دوم اینکه در سوبسترا، پیوند پپتیدی بین ریشه آسپاراتات با اسید آمینه بعدی را می‌شکنند. مشاهده

^{۱۵} Cysteine aspartate specific proteases (Caspases)

۴-۲- سوسترهای کاسپاز

تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع از سوسترهای کاسپاز شناخته شده است و مرتباً سوسترهای جدیدی به این لیست اضافه می‌گردد.^(۲۳ و ۲۴) این سوسترها پروتئین‌هایی هستند که اعمال مختلفی را انجام می‌دهند و دارای رزیدوی آسپاراتات در وضعیت خاص در ساختار خود هستند که توسط کاسپاز کاتالیز می‌شوند. تخریب این پروتئین‌ها در اغلب موارد منجر به غیرفعال شدن آن‌ها و یا فعال شدن پروتئین‌های هدف می‌گردد. در میان پروتئین‌هایی که کاتالیز آن‌ها توسط کاسپاز منجر به غیرفعال شدن آن‌ها می‌شود می‌توان از پروتئین‌های اسکلت سلولی نظیر لامین، آلفا فودرین و اکتین نام برد. از پروتئین‌های

دخیل در ترمیم DNA توپوایزومراز I، پلی ADP-ریبوز پلیمراز (PARP) و DNA-PK می‌باشند. از پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی نیز می‌توان از پروتئین رتینوبلاستوما (P^{Rb})، p21 و MDM2 نام برد.^(۲۵ و ۲۶) DNase فعال شده (CAD) به طور غیر مستقیم با تخریب زیر واحد مهاری (ICAD) و آزاد شدن زیر واحد کاتالیک، فعال می‌شود.^(۳۷-۳۹) فعال شدن کاسپاز به میزان زیادی، مختص آپوپتوز است و تعیین فعالیت کاسپازها برای تمایز بین نکروز و آپوپتوز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.^(۳۰ و ۳۱) علاوه بر نقش و اهمیت کاسپازها در فرایند آپوپتوز، کاسپازها در فرایند تکامل، تمایز و التهاب نیز دخالت دارند.^(۳۱)

References

منابع

- 1- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
- 2- Amin F, Bowden ID, Szegedi Z, Mihalik R, Szende B. Apoptotic and non-apoptotic modes of programmed cell death in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Biol Int* 2004; 24:253-60.
- 3- Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The oncologist* 1999; 4:332-9.
- 4- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62.
- 5- Hashemi M, Karami-Tehrani F, Farzami B. Caspase dependent apoptosis induced by Cladribine in the estrogen receptor negative breast cancer cell line, MDA-MB468. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 2003; 14:303-10.
- 6- Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S. Cytotoxicity effect of Cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Iranian biomedical journal* 2004;8:7-12.
- ۷- هاشمی محمد، پنجه پور مجتبی، کرمی تهرانی، فاطمه. بررسی القا آپوپتوز توسط ۲-کلرو-۲-داکسی آدنوزین در رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB468. ویژه نامه شانزدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، بهار ۸۲، ص ۳-۷.
- 8- Sjostrom J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *B M J* 2001; 322:1538-9.
- 9- Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 1999; 24:189-95.
- 10- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281:1305-8.

- 11- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-activated apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256:27-33.
- 12- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: Alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11:526-34.
- 13- Hansen TM, Nagley P. AIF: A multifunctional cog in the life and death machine. *Sci STKE* 2003; 31:1-4.
- 14- Ghavami S, Karami-Tehrani F, Hashemi M, Nikoogoftar Zarif M. Possible involvement of a specific cell surface receptor for calprotectin-induced apoptosis in colon adenocarcinoma and carcinoma cell lines (SW742 and HT29/219). *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 2004; 15:3-11.
- 15- Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, et al. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol.* (in press)
- 16- Salami S, Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clin Biochem* 2003; 36:247-53.
- 17- Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immun Methods* 2002; 265:97-110.
- 18- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383- 424.
- 19- Liang H, Fesik SW. Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol* 1997; 274:291- 302.
- 20- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1- 6.
- 21- Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced proximity model. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 96:10964-7.
- 22- Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, et al. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998; 187:587- 600.
- 23- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000; 14:1514- 25.
- 24- Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477:299- 306.
- 25- Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:821- 46.
- 26- Blajeski AL, Kaufman SH. Methods for detecting proteolysis during apoptosis in intact cells. In: *Apoptosis: A practical approach* (ed. Studzinski G.P) 1999, oxford.
- 27- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43- 50.

- 28- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391:96- 9.
- 29- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000; 256:12- 8.
- 30- Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, et al. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci* 1997; 17:553- 62.
- 31- Sadowski-Debbing K, Coy J, Mier W, Hug H, Loss M. Caspases – Their Role in Apoptosis and Other Physiological Processes as Revealed by Knockout Studies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2002; 50: 19-34.

Archive of SID