

# Apoptoza

**Apoptoza** ca termen provine de la grecescul "apoptosis", ce in traducere inseamna "caderea frunzelor". Procesul sta la temelia unor fenomene de a parasii viata, cind celula si-a realizat functia. Celula se descompune foarte fin si in etape in componentele sale moleculare, care ulterior vor fi utilizate de alte celule ale organismului. Apoptoza nu numai ca participa in anumite etape ale dezvoltarii organismului individual, dar si elimina celulele infectate de virusi, de altfel si celulele ce devin focarul produselor toxice.

Modelul mortii celulelor - pe calea **apoptozica** sau a **necrotica** - e dependenta si de concentratiile intracelulare de NAD<sup>+</sup> si ATP. Micsorarea nivelului de NAD<sup>+</sup> si ATP induce necroza celulara (F.Oliver si al., 1999, P.Nicotera si al., 1997).

Intr-un organism sanatos **moartea programata celulara (MPC)** este un mecanism de mentinerea homeostaziei. Atat hipofunctia, at si hiperfunctia apoptozei are in consecinta dereglari de homeostazie. Se considera actualmente, ca MPC este o etapa naturala de activitate a celulelor animale.

## *Mecanismele moleculare ale apoptozei.*

Apoptoza este un proces multifazic. Prima faza consta in primirea semnalului, aparitia unei informatii, transmisa in celula din exteriorul ei sau generata in compartimentele ei. Semnalul este fixat de receptor si supus analizei. Apoi semnalul este consecutiv transmis de mesagerii, de diferit rang, pana la nucleu, unde si are loc includerea programei sinuciderii celulare prin activarea genelor letale sau represia celor antiletale. Realizarea MPC in sistemele nucleare, confirma ca prezenta nucleului nu este un component obligatoriu pentru efectuarea acestui proces.

Referitor la celulele animale si ale omului, apoptoza in majoritatea cazurilor este dependenta de activatia proteolitica a cascadei de caspaze - o familie de proteaze cisteinice, evolutiv conservative, care specific scindeaza proteinele dupa resturile de acid aspartic. In corespundere cu omologia structurala caspazele se deriva in subfamili:

a) *caspazele 1 (1,4,5),*

b) *caspazele 2 (2 si c) caspazele 3 (3, 6-10)* (V.Kidd, 1999). E stabilit, ca apoptoza poate parcurge si fara aceste enzime: superproducerea proteinelor- promotori ai apoptozei Bax si Bak induc MPC in prezenta inhibitorilor caspazelor.

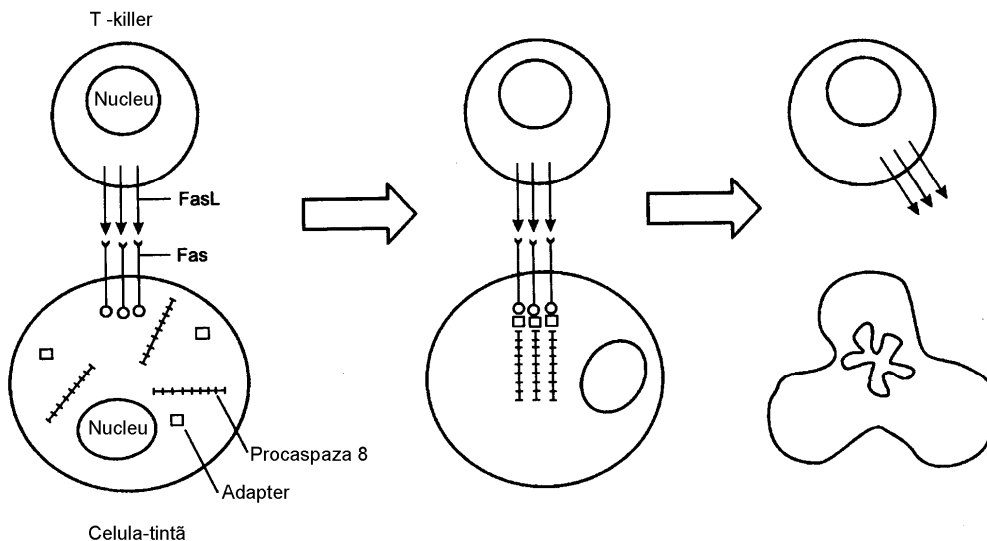
In rezultatul actiunii caspazelor are loc:

- ☉ activarea procaspazelor, cu formarea caspazelor;
- ☉ scindarea proteinelor antiapoptozice din familia Bcl-2.
- ☉ hidroliza proteinelor laminelor, ce stabilizeaza membrana nucleara, cu condensarea cromatinei;
- ☉ distrugerea proteinelor, participante la reglarea functiei citoscheletului;
- ☉ inactivarea si dereglarea reglarii proteinelor ce iau parte in reperarea DNA, splaisigului mRNA, replicarii DNA. Tinta caspazelor este poli (ADP-ribozo) polimeraza (PARP). Aceasta enzima participa la repararea DNA, catalizand poli (ADP-ribozilare) proteinele, legate de DNA. (Новомилова А. si al., 1996, Oliver F. si al., 1999).

Exista cateva cai de realizare a **MPC** (Новомилова А si al. 1996, Raff M. 1998, Kumar

S si al. 1999, Aravind L. si altii 1999):

1. *Calea determinata de inductorii fiziologici*, actiunea carora se realizeaza prin receptori celulari, ce au functia de a include mecanismele programei apoptozei. Schematic ar putea fi in felul urmatoar: inductor > receptor > adaptor > caspazele initiale > reglatori > caspazele finale. Receptorul (Fas) interactioneaza cu ligandul (FasL) (proteina transmembranara a T-Kiler), se activeaza si include PMC infectata de virus (desen 1).



Desen 1. *Apoptoza celulei tinta dependenta de Fas-receptor sub actiunea T-limfocitelor (T-kiler)*

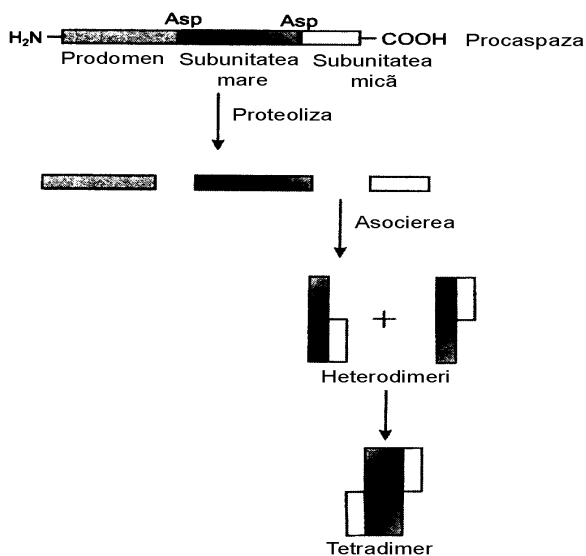
Astfel, la interactiunea cu FasL pe suprafata limfocitelor -T sau a anticorpului la Fas-receptor mor beta-limfocitele, producatoare de anticorpi ce duc Fas-receptor, care nu sunt necesare organismului insanatosit.

FasL – ligandul e componentul familiei factorilor necrotici ai tumorilor (TNF) - o familie numeroasa de liganzi homotrimeri. Fas - prezinta proteine transmembranare, care cu locusurile extracelulare interactioneaza cu trimerii liganzilor. Interactiunea receptor-ligand duce la formarea clusterelor receptorici cu fixarea locusurilor intracelulare de adaptor. Ultimii, fixandu-se pe receptori, intra in actiune cu efectorii - cu caspazele initiale, deocamdata neactive. Interactiunea descrisa se realizeaza prin proteine omofile –interactiune proteica a domeniilor mici: DD (death domain - domeniul mortii), DED (death efector domain - domeniul efectorului mortii), CARD (caspase activation and recruitment domain - domeniul activarii si recrutarii (inhibitiei) caspazei). Toate au structura asemanatoare, contin sase alfa-catene. Mai bine e studiata *procaspaza 8*. Agregatul FasL - Fas - FADD (Fas - associated DD-protein) - procaspaza 8 se activeaza, purtand denumirea de *apoptosoma* (Green D.S., 1998) sau semnal-complex, ce induce moartea (disc- death-inducing signaling complex) (Peter H. si al, 1997), sau ciaperonine apoptozice (Hengartner M., 1998).

Procaspazele poseda o activitate proteolitica joasa (1-2%) fiind in forma monomerică, concentratia lor in celula e mica. Se considera ca apropierea spatiala la agregarea lor duce la formarea caspazelor active prin auto- sau transscindare. In rezultat, de la procaspaza (masa moleculara = 30-50 kDa) se detasaza domeniul N-reglator, iar restul moleculei disociaza in 2 subunitati: mare (20 kDa) si mica (aproximativ 10 kDa) (desen2).

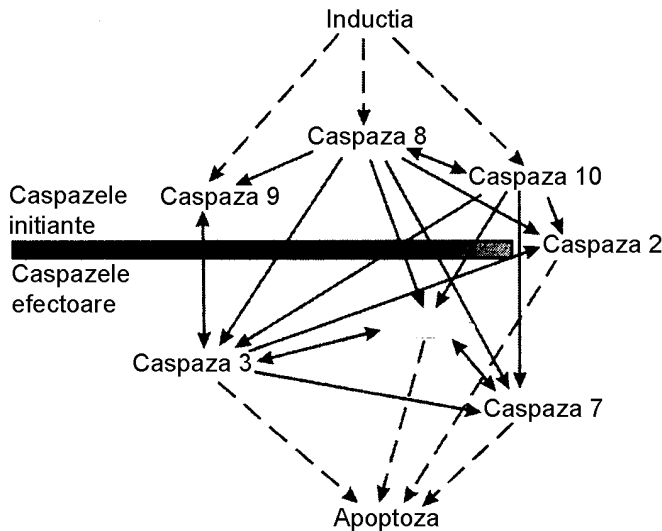
In continuare are loc asocierea lor in tetramer cu 2 centre catalitice independente, ce apare in citozolul celulei. Sunt descrise si alte cai de activare a caspazei 8.

La faza activarii caspazelor initiale viata celulei poate fi pastrata. Sunt descrisi reglatorii, care blocheaza sau accelereaza efectul distructiv al caspazelor initiale.



*Desen 2. Activarea procaspazelor prin scindare proteolitica in subunitati cu asocierea lor ulterioara.*

Caspaza 8 activeaza caspaza finala (caspaza efector): prin proteoliza se genereaza caspaza 3, dupa ce procesul MPC devine ireversibil (desen 3).



*Desen 3. Interactiunea functionala intre caspazele initiale si efectoare (finale) subfamiliei caspazei 3.*

Caspaza 2 are doua forme, una (ICH-IL) initiaza si alta (ICH-IS) inhiba apoptoza. Substratele intra- celulare nu sunt redete. Caspaza 3 se poate autoactiva, activand alte caspaze si DFF, ce duc la liza ireversibila a DNA in fragmente nucleozomale.

2. In celulele, supuse actiunii inductorului apoptozei, brusc se micsoreaza potentialul membranelor, ce duce la majorarea permeabilitatii membranei interne mitocondriale, ca consecinta la formarea porilor. (Bernardi P si al. 1998). Deschiderea porilor e determinata

de micșorarea cantității de glutatyon redus, NAD(P)H, ATP, ADP.

Recent se confirma ca un rol-cheie in apoptoza il posedea mitocondriile. Unul din simptomele cele mai timpurii ale apoptozei e depolarizarea membranei interne mitocondriale. Atit apoptoza, cit si depolarizarea membranei mitocondriale se protejeaza prin utilizarea inhibitorilor, ce blocheaza formarea de pori in membrana interna.

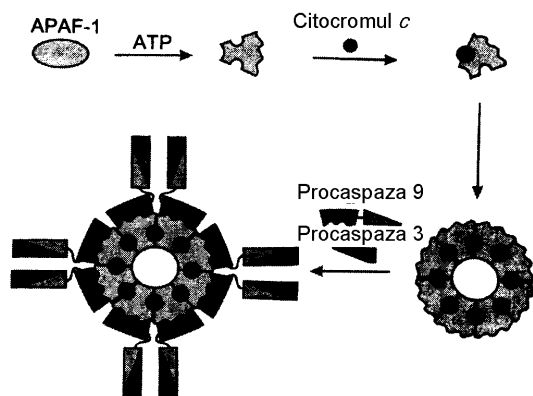
O analiza minutioasa confirma prezenta unei legi fundamentale, ce are o arie de raspandire majora in lumea animala. Si, in final, se presupune, ca diferite cauze pot provoca apoptoza, insa numai un singur mecanism permite celulei sa-si realizeze ultimatumul mortal. Care-i cauza ca celula a ales anume acest mecanism foarte compus de realizare a apoptozei?

In 1994 s-a expus ipoteza ca celula aeroba posedea un sistem esalonat de aparare la formarea superoxidului -  $O_2^{\cdot-}$ . Acest sistem functioneaza in ansamblu cu mecanismele anti-oxidante, ce neutralizeaza superoxidul format sau produsele transformarilor ulterioare.

In celulele fara DNA mitocondrial ( $p^{\circ}$ ) apoptoza poate fi provocata de *factorul necrotic cancerigen (TNF)*, dar nu de *antimicina A*. In celulele martor ( $p^+$ ), ce posedea mitocondrii cu DNA, ambele substante induc apoptoza. Se confirma ca natura semnalelor primare ce provoaca apoptoza e diferita. TNF e un semnal exterior de autodistrugere, caruia celula se supune. Antimicina A este un inhibitor specific absolut, care blocheaza transportul e<sup>-</sup> intre hemul bh si citocroma b.

Dintre proteinele mitocondriale, ca factori apoptogeni sunt si: citocrom c, procaspazele 2, 3, 9; proteina AIF (apoptosis inducing factor), ce prezinta o flavoproteina cu masa moleculara de 57 kDa.

Citocrom c impreuna cu factorul citoplasmatic APAF-1 (apoptosis protease activating factor -1) ia parte la activarea caspazei 9. APAF-1 joaca rolul de schelet, unde are loc procesingul autocatalitic al caspazei 9. Modificarile conformationale, dependente de ATP duc la fixarea cit.C (desen 4), cu aparitia a noi conformatii. Oligomerizarea duce la deschiderea CAKD pentru procaspaza 9 cu domeniul identic. In final se formeaza o apoptosoma cu masa moleculara aproximativ 1,3 mln daltoni, ce contine minimum 8 subunitati APAF-1. Apropierea conformationala a moleculelor de procaspaze 9 pe fundamentul multimeric APAF-1-cit.C duce la activarea caspazei 9. Caspaza 9 scindeaza si activeaza procaspaza 3. Flavoproteina AIF provoaca in celulele HeLa condensatia cromatinei si fragmentarea DNA, iar adaosul la mitocondriile ficatului de sobolan - eliberarea cit.C si a caspazei 9. Efectele descrise nu sunt inhibitate de inhibitorul caspazelor - *L-VADfmk*, care preintampina apoptoza, indusa de cit.C. AIF - este un efector mitocondrial al MPC ce activeaza indiferent de caspaze.



#### Desen 4. Model de formare a apoptosomei si activarea procaspazei 9.

3. In unele cazuri MPC se realizeaza ca rezultat al efectului combinat al 2 cai – cu participarea receptorilor membranei plasmatice si a citocromului C mitochondrial. Lezarea DNA duce la acumularea in celule a proteinelor genei p53, care stopeaza inmultirea celulelor si (sau) induce apoptoza. In mai mult de 50% cazuri in celulele cancerigene gena p53 este inactiva - este dereglată reglarea homeostazei celulare de p53.

Aceasta proteina, p53, este un factor de transcriptie, ce regleaza activitatea genelor. Se presupune ca, raspunsul la formarea p53 e dependent de gradul de alterare a genomului celular.

Diferite cai ale apoptozei pot interactiona intre ele. In unele cazuri calea receptorică duce la activarea procaspazei 8 - puțin eficientă. In asa caz se implica si calea mitocondrială a apoptozei - caspaza 8 interactioneaza cu proteina citozolica Bid din familia Bax, send-o in 2 componente. Capatul C-terminal al Bid se intercaleaza in membrana mitocondrială, inducand iesirea cit.C si fixarea lui de APAF-1.

4. Exista si calea de transmitere a semnalului MPC cu participarea reticulului endoplasmatic, unde-i localizata procaspaza 12. Dereglarile homeostaziei Ca<sup>2+</sup> intracelular la adaosul *tapcigarginei* sau a preparatului Ca<sup>2+</sup> ionoforic - A23187 duc la apoptoza, determinata de activarea procaspazei 12. Apoptoza, dependenta de RE este in maladia Alzheimer: (neuronii corticali la soriceii cu deficit de caspaza 12 sunt rezistenti la apoptoza indusa de o proteina amiloidica, dar nu la apoptoza indusa de cit.c sau cu participarea receptorilor membranari).

**Carnozina** este un dipeptid activ, *b-alanil-L-histidina*, extras in 1900 din muschiul scheletal. Datele experimentale confirm ca dipeptidul carnozina prezinta un antioxidant multifunctional, capabil sa inactiveze radicalii liberi, sa formeze compusi helati cu metalele prooxidante (Cu) si posedă capacitate de a forma conjugate cu produse aldehydice toxice de oxidare a lipidelor. Se considera ca si peptidele inrudite iau parte in reglarea activitatii enzimatice, in diminuarea reactiilor oxidante. Carnozina mareste longevitatea celulelor cultivate in vitro (de 2-3 ori). Poseda efect de intinerire al celulelor.

Deosebirea cardinală intre apoptoza si necroza, consta in faptul ca, pina la faza cea mai matură morfologic deosebită – formarea compusilor apoptozei si fagocitoza lor – membrana celulară isi pastreaza integritatea sa. Care va fi calea de moarte celulară se hotaraste dupa analiza multiplilor factori; unul din ei e si actiunea lezanta a formelor active de oxigen. Un fenomen timpuriu in apoptoza sunt dereglarile oxidante intre relatiile citoscheletului cu bistratul membranelor, pentru care sunt responsabile proteinele citoscheletului – *aneksinele*. In rezultat creste mobilitatea fosfatidilserinei, care normal se gaseste in stratul citozolic al membranei, insa dupa dereglarile relatiilor membrana – schelet are loc difuzie de tipul “flip-flop” – si sunt gasite in partea externa a bistratului. Activarea prelungita a receptorilor glutamici, care are loc in dereglarile functiei neuronilor, prezinta un factor ce provoacă moartea celulară. Un asa proces e numit *efect ekzatotoxic al glutamatului*. Asa mecanisme sunt determinante la imbatrinire, in caz de afectiuni ca: **parkinsonism**, **maladia Alzheimer** si in caz de **dereglari acute in circulatia cerebrala**.

## ROLUL SFINGOZINEI SI A PRODUSILOR EI IN REGLAREA MORTII CELULELOR

Studiile lui Hannum Y. si Bell P. (1987) confirma capacitatea **sfingozinei** de a inhiba activitatea *proteinkinazei C* - ferment cheie in reglarea proceselor proliferative si de diferentiere a apoptozei. Autorii considera rolul sfingozinei drept un mesager secund.

Unele izoforme ale PKC sunt foarte sensibile la actiunea *ceramidei* si *sfingomielinei* si practic aproape toate sunt inhibitate de sfingozina si derivatii sai. Gradul de inhibitie a activitatii fermentative e dependent de relatiile cantitative intre fosfatidilserina,  $Ca^{2+}$ , diacilglicerina, eterul forbol, lizofosfatidilcolina si acizii grasi. Analogul structural, stearilamina, inhiba PKC ca si sfingozina, pe cind octilamina nu poseda efect asemanator. Se confirma ca efectul e dependent nu numai de grupa  $NH_2$ , dar si de marimea lantului.

Azi se considera argumentat ca *sfingozina* si *sfingonina* sunt inhibitorii endogeni ai PKC. Majorarea sfingozinei in celule la influenta diferitor factori este rezultatul scindarii *ceramidei*, dar nu a sintezei de *novo*. Eterul forbol, ca si acidul arahidonic, duce la majorarea de 1,5 ori a nivelului *ceramidei* in celule.

Se confirma prezenta PKC si in nucleul celulei, posibil o modificare a formei citoplasmice. Prezenta sfingozinei in nucleu si modificarile concentratiei sale in procesele legate de activarea nucleului celular presupun rolul nemijlocit ca reglator negativ al enzimelor localizate in structurile nucleice.

Sfingozina influenteaza si asupra agregatiei trombocitelor, inhiba coagularea, are un efect anticancerigen si antimicrobial, precum si capacitatea de a induce apoptoza.

Apoptoza, moartea programata a celulei, sta la baza selectiei pozitive si negative a T si B-limfocitelor etc., joaca un rol deosebit in apararea organismului de infectii virale. Imunodeficitul la SID-infectie e determinata de dereglarile in controlul apoptozei.

*Fosfolipidele* sunt sursa de mesageri secunzi, ce iau parte la reglarea activitatii enzimelor apoptozei - a *proteinkinazelor*, *fosfatazelor*, *proteazelor*. Interactiunea moleculelor -semnale cu receptorul induce activatii in enzimele lipolitice ( $FLA_2$ , C, D si *sfingomielinazei*) cu acumularea posterioara a rezultatelor hidrolizei FL (ac.arahidonic, DAG, *ceramidei*), care nemijlocit participa la transmiterea semnalelor induse. Dar numai produsele ciclului *sfingomielinei* (*ceramida* si *sfingozina*) poseda activitate proapoptozica la contactul cu celula. S-a demonstrat ca acidul arahidonic, AP, DAG, activeaza *sfingomielinaza* si in final sunt capabili sa induca acumularea in celula a produselor ciclului *sfingomielinic*.

Ca si *sfingozina*, efect sinergic la actiunea comuna cu *ceramida* asupra celulei au si alti inhibitori ai PKC. *Ceramida* este activator al *fosfatazelor*. Celulele rezistente la apoptoza nu sunt capabile sa acumuleze *ceramida* si *sfingozina*. *Ceramida* induce apoptoza in concentratii mai mari decit *sfingozina* si se presupune ca actiunea stimulanta a lor e mai efectiva in apoptoza la actiunea toxica asupra celulei. *Sfingozina* majoreaza efectul toxic asupra celulei al diferitelor preparate antitumorale.

*Fumonizina B*, e un inhibitor al *ceramidsintazei* - enzima-cheie in biosinteza lipidelor *de novo* si in transformarea *sfingozinei* in *ceramida*, inhiba cresterea celulelor si induce moartea lor dupa tipul apoptozei. Ca rezultat al efectului FB, in celula se acumuleaza *sfinganina* si *sfingozina*, care induce apoptoza. *Sfingozina* interactioneaza activ cu DNA (enzimele replicatiei si transcriptiei). Ea implica formarea mutatiilor de tipul modificarilor

scarii informative, aparute la efectul antibioticului intercalar - *carminomicinei*.

Efectul dublu al sfingozinei consta in urmatoarele: *in citosol* regleaza enzimele care transmit semnalul apoptozei (fosfokinaze si proteaze), *in nucleu* favorizeaza degradarea DNA, interactionind cu ea.

In concentratii mici (pina la 10 mkM) sfingozina stimuleaza sinteza DNA, iar in concentratii mai mari, apare moartea celulei. Este confirmat ca si compusii ei sunt foarte toxici pentru toate celulele, inclusiv si pentru cele canceroase. In unele conditii au efecte sinergiste in combinatie cu alte preparate antitumorale.

### *Reglarea de catre proteinele IAP*

Activarea caspazelor si activitatea lor pot de asemenea fi reglate de interactiunea cu *proteine inhibitorii ale apoptozei (IAP)*. Genele care codifica proteinele virale IAP, la fel ca spectrul larg al caspazei inhibitorii *p35*, au fost clonate mai intai de la bacilo-virusuri bazandu-se pe abilitatea lor de a inhiba virusurile inducand apoptoza in celulele lepidopterane. Desi celulele mamiferelor nu par sa contina omologii lui *p35*, cel putin 5 omologi de la mamifere ai proteinei bacilo-virale IAP au fost descrisi. Patru dintre aceste polipeptide, *cIAP-1*, *cIAP-2*, *XIAP* si *NAIP*, fiecare avand un domeniu **N** terminal, continand multiple copii ale asa-numitului motiv repetitiv al bacilo-virusului IAP (*BIR*), si un **C** terminal continand domeniu de interactiune proteina- proteina (*RING*). Al cincilea contine numai un domeniu *BIR*. La fel ca omologii virali, fiecare din aceste polipeptide poate inhiba apoptoza indusa de o varietate de stimuli. *XIAP*, *cIAP-1*, *cIAP-2* dar nu si *NAIP* se leaga la o caspaza inhibitorie activa 3 sau 7, de la o concentratie subnanomolara (*XIAP*) la una submicromolara (*cIAP-1* si *cIAP-2*). De asemenea, se leaga la o procaspaza 9 si impiedica activarea ei. Pentru *XIAP* un singur domeniu *BIR* pare sa fie responsabil de aceste efecte. Observatia ca *cIAP-1* de asemenea se leaga de *TNFR-1* asociat polipeptidelor *TRAF-1* si *TRAF-2* in cursul interactiunii cu motivele *BIR* cresc posibilitatea ca *cIAPs*, ca si *IAPs*-urile virale, pot produce efecte aditionale inhiband moartea receptorilor care activeaza caspazele.

Expresia moleculelor IAP la mamifere variaza larg printre diferitele tipuri de celule. Expresia supravietuirii, spre exemplu este mai inalta intr-o varietate de tumori decat in celulele normale. *cIAP-1*, *cIAP-2* si *XIAP* au fost identificate ca inductori *NF-KB* ai transcripției care contribuie la protectia unor celule mediata de *NF-KB* fata de apoptoza indusa de *TNF $\alpha$* . Expresia acestor polipeptide in conditii aditionale fiziologice si patologice necesita studii aprofundate.