ОСНОВНИ СИГНАЛНИ ПЪТИЩА НА АПОПТОЗА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Теодорика Панайотова[1,2], Драгомир Стоянов[1,2], Ростислав Манев[1,2], Маргарита Манева[1,2], Боряна Стефанова[1,2], Елеонора Димитрова[1,2], Николай Цонев[1,2]

[1]Клиника по медицинска онкология, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна
[2]Катедра по онкология, Факултет по медицина, Медицински университет – Варна

KEY APOPTOSIS SIGNALING PATHWAYS IN MALIGNANT DISEASES

Teodorika Panayotova[1,2], Dragomir Stoyanov[1,2], Rostislav Manev[1,2], Margarita Maneva[1,2], Boryana Stefanova[1,2], Eleonora Dimitrova[1,2], Nikolay Tsonev[1,2]

[1]Clinic of Medical oncology, UMHAT Saint Marina, Varna
[2]Department of Oncology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Апоптозата е процес на контролирана клетъчна смърт при многоклетъчните организми. Въпреки сложните механизми на контрол апоптозата може да избегне регулаторните процеси, което да доведе до клетъчна пролиферация и онкогенеза.

Няколко важни сигнални пътя засягат контролираната клетъчна смърт, включително AKT сигнализирането и p53-медиираните пътища на апоптоза, а също така и два основни клетъчни пътя – външен и вътрешен, които са и най-добре изучените.

Прилагането на прицелни терапии, които са насочени към специфични молекули, участващи в регулацията на апоптозата, е възможен нов подход към лечението на онкологичните заболявания.

Ключови думи: *апоптоза, рак, канцерогенеза*

ABSTRACT

Apoptosis is a process of controlled cell death in multicellular organisms. Despite complex control mechanisms, apoptosis can escape the regulatory processes, leading to cell proliferation and oncogenesis.

Several important signaling pathways affect controlled cell death, including the AKT signaling pathway and p53-mediated apoptosis pathways, as well as two major cellular pathways—external and internal, which are best studied.

The use of targeted therapies that interfere with specific molecules involved in the regulation of apoptosis is a possible new approach to cancer treatment.

Keywords: *apoptosis, cancer, carcinogenesis*

Апоптозата е естествен процес, при който в клетката се задействат механизми, водещи до програмирана смърт. Идентифицирани са два основни пътя, които водят до апоптоза: външен (extrinsic) и вътрешен (intrinsic) път, като и при двата се стига до активиране на семейство от Cys (Cysteine) протеази, наречени каспази, които действат в протеолитична каскада, свързана с разграждането на мъртвата клетка (1).

ВЪНШЕН ПЪТ НА АПОПТОЗАТА

Външният път се активира от събития извън самата клетката - условията в извънклетъчната среда определят, че клетката трябва да загине. Въз основа на стимула, който задейства механизмите на апоптозата, могат да се идентифицират най-малко два апоптотични пътя:

- стартиран чрез рецепторни системи и рецептор-медииран път,
- стартиран чрез цитотоксичен стрес.

Рецептор-медиирани пътища на апоптозата

Рецепторно-медиираните пътища се активират от определени лиганди – DL (Death Ligands). Death Receptors (DRs) са рецептори, които са експресирани на клетъчната повърхност, като те са в основата на активирането на Death Caspases (DCs), което става в рамките на секунди след свързване с лиганда и причинява апоптотично разпадане на клетката в рамките на часове. DR принадлежат към супер фамилията на TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), като те притежават извънклетъчен домейн, който е богат на цистеин, и хомоложен вътреклетъчен домейн, известен като DD (Death Domain). Адапторни молекули като FADD (Fas-Associated via Death Domain), TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor-1-Associated Death Domain) и Daxx съдържат DD, които взаимодействат с DRs и предават апоптотичния сигнал надолу в сигналния път. Едни от най-подробно изучаваните рецептори са Fas и TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-1). Други DRs включват Apo2 и Apo3 (2) (фиг. 1).

FasL (Fas Ligand) е хомотримерен протеин, който действа като лиганд за Fas и води до олигомеризация на рецептора, а оттам и до образуване на клъстер (скупчване) на DD и свързването на кофактора FADD. Протеинът FADD се свързва чрез своя мотив - DED (Death Effector Domain) с хомоложен мотив в Procaspase-8. Комплексът на Fas, FADD и ProCaspase-8 се нарича DISC (Death Inducing Signaling Complex). Кофакторната функция на FADD, от друга страна, се блокира при взаимодействие с регулатора FLIP (FLICE Inhibitory Protein). При натрупване на FADD, Procaspase-8 олигомеризацията задейства авторазкъсване и автоактивация. Активната Procaspase-8 на свой ред предава сигнала на Caspase-3 и 7, което води до апоптоза (3).

Активираната Caspase-8 може активира Caspase-3 по два пътя. При първия Caspase-8 разкъсва BID (Bcl2 Interacting Protein) и неговия COOH-остатък навлиза в митохондриите, където медиира освобождаването на CytoC (Cytochrome-C). Освободеният CytoC се свързва с APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), dATP и Procaspase-9 и активира Caspase-9. Caspase-9 разкъсва Procaspase-3 и активира Caspase-3. При другия път Caspase-8 разкъсва Procaspase-3 директно. Caspase-3 разкъсва DNA fragmentation factor ICAD (инхибитор на Caspase-Activated DNase) в хетеродимерна форма, състояща се от CAD и разкъсани ICAD. Скъсеният ICAD се дисоциира от CAD, предизвиквайки олигомеризация на CAD, която има ДНКазна активност. Активният CAD олигомер причинява вътрешна нуклеозомална фрагментация на ДНК (кондензация на хроматина), която е белег на апоптозата (3-5).

Наскоро бе идентифициран и ядрен път, който е свързан с апоптоза. (ZIPK) ZIP Kinase предизвиква апоптоза чрез PODs (PML (Promyelocytic Leukemia) Oncogenic Domains) в присъствието на Daxx и Par-4 (Prostate Apoptosis Response Protein-4). Друга група от DRs - Apo2 и Apo3 взаимодействат с лиганд, известен Apo2L (Apo2 Ligand), Apo3L (Apo3 Ligand), като образуването на DISC комплекс и BID разкъсването надолу по пътя на Apo2/Apo3 е аналогичен на Fas пътя (3,4).

При активиране на TNFR1 се образуват нетрайни комплекси в плазмената мембрана с различни DD съдържащи протеини (Death Domain съдържащи протеин) - TRADD, TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor-2), CIAP1 (Cellular Inhibitor of Apoptosis-1) и RIP1 (Receptor-Interacting Protein-1), които привличат IKK (I-KappaB-Kinase), активираща NF-KappaB (Nuclear Factor-KappaB). Всичко това води до клетъчно оцеляване(6).

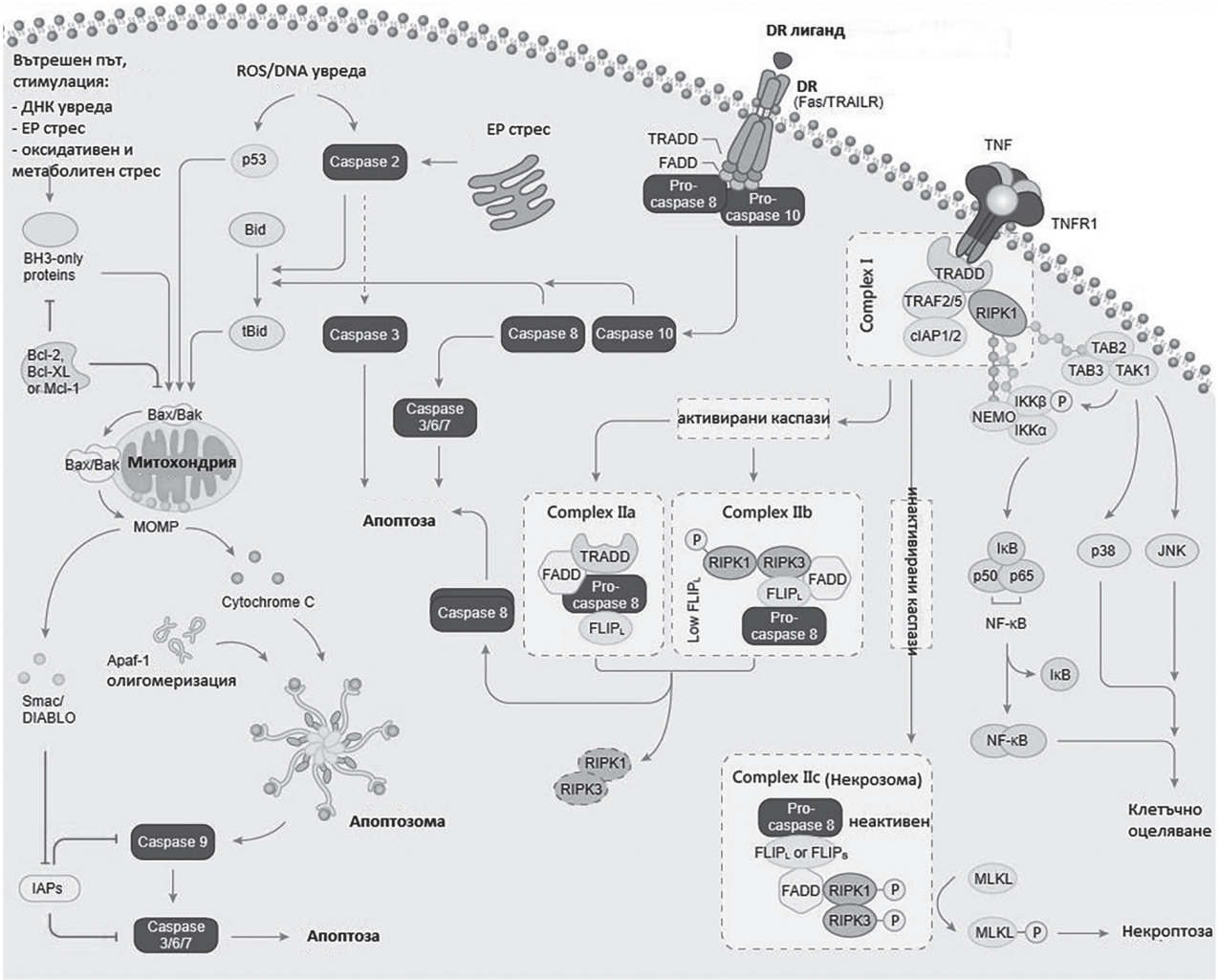
Освен чрез DR, растежните фактори контролират апоптозата чрез пътищата на PI3K (Phosphatidylinositde-3 Kinase) и Akt (v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog). Активирането на PI3K пътя води до активиране на Akt. Akt е много важен при регулацията на BAD (Bcl2-Antagonist of Cell Death), който е проапоптотичен член на семейството Bcl2 (B-Cell Leukemia-2) и участва в митохондриална апоп-

тоза. PKC (Protein Kinase-C) също играе важна роля в апоптозата чрез активиране на p90RSKs (Ribosomal-S6 кинази), които инхибира BAD (7,8).

Апоптоза медиирана от увреждане на клетката (стрес-индуцирана апоптоза)

Освен чрез рецепторна медиация апоптозата може да се активира и при увреждане на клетката. Йонизиращи лъчения, лечение с цитотоксични медикаменти, както и липсата на цитокини може да доведат до задействане на процеса на програмирана клетъчна смърт. Механизмите на стрес-индуцираната апоптоза включват промяна в митохондриалната пропускливост, последващото освобождаване на CytoC и образуването на апоптозома, каталитична мултипротеинова платформа, която активира Caspase-9. Активираната Caspase-9 стимулира разкъсването на Caspase-3, което води до поредица от събития, свързани с клетъчна смърт. Освобождаването на CytoC се регулира от фамилията протеини на Bcl2. Bcl2L (Bcl2-Like), BclXL (Bcl2 Related Protein Long Isoform) и други антиапоптозни Bcl2 членове на семейството се намират във външната митохондриална мембрана и предотвратяват освобождаването на CytoC. BAX (Bcl2 Associated X-protein), BID ((Bcl2 Associated X-protein) и BIM (Bcl2-Interacting Protein) са първоначално неактивни и трябва да се транслоцират до митохондриите, за да индуцират апоптоза, чрез директно взаимодействие с BH3 домейни на Bcl2, BclXL и Bfl1 и антагонизиране на действието на тези антиапоптозни протеини.

MMP (Mitochondrial Membrane Permeabilization) или промяната в митохондриалната пропускливост е в основата на стрес-индуцираната апоптоза. Идентифицирани са най-малко два механизма на MMP. Първият включва VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), ANT (Adenine Nucleotide Transporter), PBR (Peripheral-type Benzodiazepine Receptor) и CypD (Cyclophilin-D), които заедно формират PTPC (Permeability Transition Pore Complex).



Фиг. 1. Основни сигнални пътища на програмирана клетъчна смърт

Източник фигура: https://www.medchemexpress.com/Pathways/Apoptosis.html

Този комплекс взаимодейства с BAX, BAK1 (Bcl2 Antagonist Killer-1) или BIM, като това води до ускоряване на отварянето на канала, или с BclXL, което води до затваряне му. Вторият механизъм е свързан с освобождаването на BAX при взаимодействието му с 14-3-3 протеините и последващата му транслокация от цитоплазмата в митохондриите, където олигомеризира и образува протеинови пори. BAK1 се локализира в митохондриите и може да формира пори чрез олигомеризация и асоцииране с tBID, като механизмите са подобни на тези на BAX. BID се активира чрез Caspase-8 в хода на DR сигнализацията (9,10).

ВЪТРЕШЕН ПЪТ НА АПОПТОЗАТА

Вътрешният път на апоптоза се активира при клетъчно увреждане, което може да бъде причинено от задействан онкоген, директно увреждане на ДНК, хипоксия, нарушения в баланса на цитокините. p53 е сензор за клетъчно увреждане и има ключова роля при активиране на вътрешния път. ДНК чекпойнт протеините (DNA checkpoints proteins) - ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated protein) и Chk2 (Checkpoints Factor-2), директно фосфорилират и стабилизират p53 и инхибират медиирано от MDM2 (Mouse Double Minute-2 Homolog) убиквитиниране на p53. MDM2 се свързва с p53 и медиира ядрения експорт. При това взаимодействие p53 вече не може да функционира като активатор на транскрипцията. p53 инициира апоптоза чрез транскрипционно активиране на проапоптотични Bcl2 членове на фамилията и потиска антиапоптотични Bcl2 и CIAPs. Други таргети на p53 включват BAX, Noxa, PUMA (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis) и наскоро идентифицирания BID. p53 също трансактивира други гени, които могат да стимулират апоптоза - PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted On Chromosome-10), APAF1, Perp, p53AIP1 (p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein-1), и гени, които водят до индуциране на ROS (Reactive Oxygen Species). ROS води до генерализирано оксидативно увреждане на митохондриалните компоненти. Пораженията на митохондриалната ДНК нарушават окислителното фосфорилиране, което е в основата на редица заболявания (11,12).

При увреждане на митохондриите се освобождават и други протеини - (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase), Diablo, Arts и Omi/HTRA2 (High Temperature Requirement Protein-A2), които антагонизират на ефекта на IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), предотвратяващи активирането на Caspase-3 при нормални условия. Взаимодействието между членовете на фамилията на Bcl, IAPs, SMAC и Omi/HTRA2 е в основата на вътрешния апоптозен път (13).

Нови изследвания доказват, че друга нуклеаза EndoG (Endonuclease-G) се активира специфично от апоптотични стимули и индуцира нуклеозомна фрагментация на ДНК, независимо от Caspase и от DFF (DNA-Fragmentation Factor)/ CAD (Caspase-Activated DNAse). EndoG е митохондрия-специфична нуклеаза, която се транспортира в ядрото и разкъсва ДНК хроматина по време на апоптозата. Друг протеин AIF (Apoptosis Inducing Factor) също има роля в апоптозата след транслокация от митохондриите в ядрото, където участва в процеса на кондензацията на хроматина и фрагментацията на ДНК (13).

Редица проучвания сочат, че нарушенията в пътищата на апоптозата играят решаваща роля в канцерогенезата. Въз основа на това се смята, че стратегии насочени към повлияване механизмите на апоптоза са нови потенциални терапевтични опции при лечението на редица онкологични заболявания. Някои от тези открития са все още на ниво предклинични тестове, докато други са вече обект на клинични изпитвания. Освен възможностите за самостоятелно приложение новите лекарствени молекули демонстрират потенциал за ефективност в комбинация със стандартните цитотоксични средства. Съществуват, разбира се, и въпроси породени от дългогодишната употреба на конвенционалните противоракови средства, чиито отговор все още не е ясен. Като например дали тези нови стратегии няма да доведат до лекарствена резистентност и поразяване на голям брои от нормалните клетки, паралелно с малигнените. От друга страна, клиничната полза от молекули, таргетиращи конкретен път или протеин, би била неоспорима за избягване на системна токсичност. Въпреки това голяма част от медикаментите, включени в клинични изпитвания, притежават възможности за свързване с различни рецептори (например много инхибитори на Bcl-семейството протеини). Поради тази причина основният стремеж е насочен към търсенето на препарати, водещи до избирателна апоптоза единствено в клетките с малигнен фенотип. Към днешна дата е необходимо натрупването на голям брой доказателства за утвърждаване на тази нова лекарствена стратегия, но все пак в неравностойната битка с онкологичните заболявания всеки потенциален съюзник е ценен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peter ME. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. Nature 2011; 471(7338): 310-2.
2. Muntane J. Harnessing tumor necrosis factor receptors to enhance antitumor activities of drugs. Chem Res Toxicol 2011; 24(10): 1610-6.
3. Lalaoui N, Morle A, Merino D, et al. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. PLoS One 2011; 6(5): e19679.
4. Bojarska-Junak A, Sieklucka M, Hus I, et al. Assessment of the pathway of apoptosis involving PAR-4, DAXX and ZIPK proteins in CLL patients and its relationship with the principal prognostic factors. Folia Histochem Cytobiol 2011; 49(1): 98-103.
5. Shirley S, Morizot A, Micheau O. Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. Recent Pat Anticancer Drug Discov 2011; 6(3): 311-23.
6. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol 2008; 214(2): 149-60.
7. Shirley S, Micheau O. The heme oxygenase-1 and c-FLIP in acute myeloid leukemias: two non-redundant but mutually exclusive cellular safeguards protecting cells against TNF-induced cell death? Oncotarget 2010; 1(5): 317-9.
8. Ebi H, Corcoran RB, Singh A, et al. Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. J Clin Invest 2011; 121(11): 4311-21.
9. Zhang XP, Liu F, Wang W. Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108(22): 8990-5.
10. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. Basic Res Cardiol 2009; 104(2): 181-8.
11. Cheng Q, Chen J. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. Cell Cycle 2010; 9(3): 472-8.
12. Lahav G. Oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop. Adv Exp Med Biol 2008; 641: 28-38.
13. Cagnol S, Mansour A, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC. Raf-1 activation prevents caspase 9 processing downstream of apoptosome formation. J Signal Transduct 2011; 2011: 834948.

Адрес за кореспонденция:
Теодорика Виталинова Панайотова
Катедра по онкология
бул. „Христо Смирненски“ 1
Варна, 9000
e-mail: teodorikapanayotova@abv.bg