

Απόπτωση Ο κυτταρικός θάνατος προϋπόθεση για τη ζωή

Η απόπτωση είναι η μορφή του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται όταν ο θάνατος είναι επιθυμητό ή προγραμματισμένο γεγονός. Είναι ο πρώτος χαρακτηρισμός ενός ενεργητικά ρυθμιζόμενου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου στα θηλαστικά, που διαφέρει μορφολογικά και βιοχημικά από τη νέκρωση. Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα στερεοτυπικό πρόγραμμα κυτταρικής «αυτοκτονίας», με το οποίο οι πολυκυτταρικοί οργανισμοί εξαλείφουν γηρασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Τα προϊόντα των γονιδίων, που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν καλύτερα στο νηματοειδή σκώληκα *C. elegans*. Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον έλεγχο της απόπτωσης γίνεται όλο και μεγαλύτερο, καθώς αναγνωρίστηκε ο ζωτικός ρόλος της στη φυσιολογική ανάπτυξη, την ομοιόσταση των ιστών και την άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα, έγινε αντιληπτό ότι η διαταραχή της ισορροπίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού-προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει στον καρκίνο, καθώς και σε αυτοάνοσα και εκφυλιστικά νοσήματα. Ο αποπτωτικός μηχανισμός είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Στην ανασκόπηση αυτή παρουσιάζονται τα δεδομένα, που υπάρχουν μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία, για τις οδούς μετάδοσης των αποπτωτικών σημάτων από τους διάφορους υποδοχείς θανάτου στα πρωτεολυτικά ένζυμα που είναι γνωστά ως κασπάσες και οδηγούν στην κατάτμηση του DNA και τη λύση του κυττάρου. Η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών χαρακτηριστικών της αποπτωτικής διαδικασίας θα επιτρέψει την ανάπτυξη και εφαρμογή περισσότερο δραστικών και δυναμικά αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών, στις οποίες βασικό ρόλο θα έχει η επαγωγή ή αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ανάλογα με την περίπτωση.

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η απόπτωση είναι μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες λέξεις στη σύγχρονη Ιατρική και Βιολογία, αφού μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περί τις 20.000 σχετικές αναφορές. Πρόκειται για αρχαία ελληνική λέξη, που στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί σε Ιπποκρατικά και Γαληνικά συγγράμματα, καθώς και σε συγγράμματα ρωμαίων ιατρών.

Συνώνυμο της απόπτωσης είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που εκφράζει τη ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση ενός προϋπάρχοντος προγράμματος θανάτου κωδικοποιημένου στο γενετικό υλικό.

Μ. Ανδρίκουλα,¹
Γ. Βαρθολομάτος²

¹Ενδοκρινολογικό Τμήμα,
Τομέας Παθολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
²Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα
Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Apoptosis: Cell death necessary
for life

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση
Κασπάσες
Νέκρωση
Υποδοχείς θανάτου

Υποβλήθηκε 31.5.2000
Εγκρίθηκε 12.1.2001

Τον κυτταρικό θάνατο κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη περιέγραψε για πρώτη φορά ο Glucksmann το 1951.¹ Το 1965, ο Kerr μελέτησε το θάνατο των ηπατοκυττάρων, μετά από απολίπωση κλάδου της πυλαίας φλέβας, όπου διέκρινε εστίες νέκρωσης, αλλά παρατήρησε και διάσπαρτα, μονήρη ηπατοκύτταρα με συρρικνωμένους πυρήνες και πυρηνικές μάζες, χωρίς ένδειξη λύσης των λυσοσωμάτων ή στοιχεία φλεγμονής.² Το 1971, μετά από παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διαπίστωσε ότι οι πυρηνικές μάζες ήταν σωματίδια περιβαλλόμενα από μεμβράνη, που περιείχαν τμήματα συμπυκνωμένης χρωματίνης και κυτταροπλασματικά οργανίδια και αποκάλεσε το φαινόμενο «νέκρωση εκ συρρι-

κνώσεως». Το 1972, οι Kerr και Searle, εμπνεόμενοι από την Ιλιάδα, θεώρησαν ότι η εκλεκτική και προγραμματισμένη απομάκρυνση των κυττάρων από τον οργανισμό προσομοιάζει με «τα φύλλα που ο άνεμος χαμάδις χέει» και πρότειναν να ονομαστεί το φαινόμενο «απόπτωση».³

Παρόλο που η απόπτωση έχει περιγραφεί εδώ και δεκαετίες ως ξεχωριστό βιολογικό φαινόμενο, μόνο πρόσφατα έγιναν σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση των θεμελιωδών μηχανισμών που τη ρυθμίζουν. Οι περισσότερες γνώσεις μας για τον αποπτωτικό μηχανισμό προέρχονται από τη μελέτη του νηματοειδούς σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, ενώ η μεγαλύτερη πρόοδος συντελέστηκε από την ταυτοποίηση των «γονιδίων θανάτου» πριν από μία δεκαετία.

2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗ

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι θανάτου των ευκαρυωτικών κυττάρων: η νέκρωση και η απόπτωση. Η νέκρωση (accidental cell death) είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες, όπως είναι η ισχαιμία, η υπερθερμία, η υποθερμία, η υποξία, ο φυσικός ή χημικός τραυματισμός. Χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου. Η νέκρωση, σε αντίθεση με την απόπτωση, οδηγεί συχνά σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση.⁴

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (apoptosis or programmed cell death, PCD) είναι φυσιολογική μορφή «αυτοκτονίας» του κυττάρου,⁵ που εμφανίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη⁶ και την εξέλιξη των οργάνων.^{7,8} Χαρακτηρίζεται από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές, όπως την ταχεία δημιουργία μαλακής προσεκβολής της πλασματικής μεμβράνης (blebbing) χωρίς απώλεια της ακεραιότητάς της, τη διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού, την εκτεταμένη καταστροφή στη χρωματίνη, την κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την απώλεια μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη συρρίκνωση του κυττάρου (πίνακες 1, 2). Η διάτρηση της κυτταρικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία «αποπτωτικών σωματιδίων» διαφόρων μεγεθών και σύστασης, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με τη μεμβράνη (εικ. 1), φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα και διασπώνται από λυσοσωματικά ένζυμα.

Παρόλα αυτά, έχουν εντοπιστεί και κύτταρα που, κατά το θάνατό τους, εμφανίζουν μίγμα αποπτωτικών και νεκρωτικών μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η ενδιά-

Πίνακας 1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης και απόπτωσης.

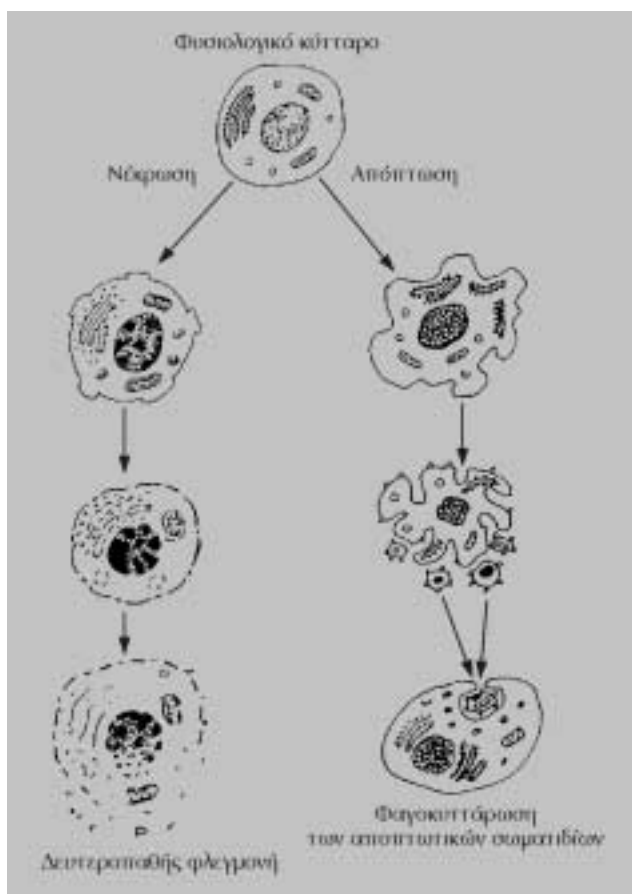
Νέκρωση	Απόπτωση
- Απώλεια ακεραιότητας μεμβράνης	- Blebbing κυτταρικής μεμβράνης χωρίς απώλεια ακεραιότητας
- Οίδημα κυτταροπλάσματος και μιτοχονδρίων	- Συσσωμάτωση χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη
- Πλήρης λύση του κυττάρου	- Συρρίκνωση κυτταροπλάσματος
	- Συμπύκνωση πυρήνα
	- Κατάτμηση κυττάρου σε μικρότερα τμήματα
	- Δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων

Πίνακας 2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά νέκρωσης και απόπτωσης.

Νέκρωση	Απόπτωση
- Απορρύθμιση της ομοιόστασης ιόντων	- Ισχυρά ρυθμιζόμενη διαδικασία με ενεργοποίηση ενζύμων
- Παθητική διαδικασία Δεν απαιτείται ενέργεια	- Ενεργητική διαδικασία ATP-εξαρτώμενη
- Τυχαία πέψη του DNA (smear DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης)	- Όχι τυχαία κατάτμηση του DNA (ladder pattern μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης)
- Κατάτμηση του DNA μετά τη λύση του κυττάρου	- Κατάτμηση DNA πριν τη λύση του κυττάρου
	- Απελευθέρωση παραγόντων από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (κυτόχρωμα c, AIF)
	- Ενεργοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης των κασπασών
	- Μεταβολές στη μεμβράνη (π.χ. μετατόπιση φωσφατιδυλοσερίνης από την κυτταροπλασματική στην έξω λιπιδική σιβάδα της μεμβράνης)

μεση αυτή μορφή θανάτου φαίνεται ότι οφείλεται στη διαφορετική κάθε φορά έκφραση αλληλοεπικαλυπόμενων νεκρωτικών και αποπτωτικών διαδικασιών και την κάλυψη της απόπτωσης από τη λεγόμενη «δευτεροπαθή νέκρωση»⁹ (εικ. 1). Αυτή η κατάσταση μπορεί να ονομαστεί «νεκραπόπτωση» (necrapoptosis).

Η μορφή του κυτταρικού θανάτου (νεκρωτική, αποπτωτική ή νεκραποπτωτική) εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια των τραυματικών ερεθισμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια. Έτσι, κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία της από-



Εικόνα 1. Τα στάδια και οι μορφολογικές διαφορές νέκρωσης και απόπτωσης.

πτώσης, μπορεί στη συνέχεια να υποστούν νέκρωση λόγω ελάττωσης των ενεργειακών επιπέδων, όπως υποστηρίζουν ορισμένοι ερευνητές.¹⁰ Αυτή η αλληλοεπικάλυψη νεκρωτικών και αποπτωτικών φαινομένων είχε ως αποτέλεσμα τη λανθασμένη ερμηνεία μηχανισμών κυτταρικού θανάτου σε ιστούς που νοσούν και κυρίως σε ιστούς που εμφανίζουν ισχαιμία.

Πρέπει να αποδεχθούμε ότι ο όρος «νέκρωση» είναι ανακριβής, αφού αναφέρεται σε πληθώρα μεταβολών που εμφανίζονται τόσο στον «προγραμματισμένο» όσο και στον «τυχαίο» (accidental) κυτταρικό θάνατο. Επομένως, επειδή η απόπτωση είναι μια ισχυρά ρυθμιζόμενη και ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία, ο όρος «μη αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος» (non-apoptotic cell death) είναι πιο κατάλληλος σε σύγκριση με τον όρο «νέκρωση».

3. Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΝΟΣΟ

Η ομοιότητα διατηρείται στους πολυκύτταρους οργανισμούς με την ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου. Η απόπτω-

ση είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου, χάρη στην οποία επιτυγχάνεται η συνεχής ανανέωση των ιστών με κυτταρική διαίρεση, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται το επίπεδο σταθερότητας των διαφόρων ιστολογικών διαμερισμάτων.

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος συναντάται σε πολλές φυσιολογικές καταστάσεις στο νευρικό σύστημα,¹¹ σε ενδοκρινεξαρτώμενους ιστούς, σε πολλά στάδια επιλογής και διαφοροποίησης των Β- και Τ-κυττάρων, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ογκογένεση, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις^{12,13} (πίνακες 3–5).

4. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της ρύθμισης και της ολοκλήρωσης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου θα επιτρέψει τη σημαντική βελτίωση της ανάπτυξης των θεραπευτικών στρατηγικών για πολλές νόσους. Παρά τις αξιόλογες προόδους των τελευταίων 10 χρόνων, η πλήρης κατανόηση του αποπτωτικού μηχανισμού δυσχεραίνεται από την πολυπλοκότητά του και το πλήθος των σημάτων που ελέγχουν την ενεργοποίησή του.

Η πολυπλοκότητα του μηχανισμού αυτού οφείλεται στο γεγονός ότι οι ίδιες οδοί χρησιμοποιούνται και για τη μετάδοση σημάτων αύξησης και διαφοροποίησης, όπως τα εξωκυττάρια σήματα (τροφικοί παράγοντες και ορμόνες) καθώς και τα σήματα από γειτονικά κύτταρα, που

Πίνακας 3. Παθήσεις που σχετίζονται με μειωμένη απόπτωση.

Νεοπλασία
Λεμφώματα
Λευχαιμίες
Καρκινώματα με μεταλλάξεις p53
Ορμονοεξαρτώμενοι όγκοι (καρκίνος μαστού, προστάτη, ωθηκών)
Αυτοάνοσες διαταραχές
Αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο (σύνδρομο Canale-Smith)
Συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος
Σπειραματονεφρίτιδα από ανοσοσυμπλέγματα
Ενδοκρινικές διαταραχές και διαταραχές μεταβολισμού
Νόσος του Graves
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1
Οστεοπόρωση
Ιογενείς λοιμώξεις
Ερπητοϊοί
Ιοί Pox (Cowpox virus ctmA)
Αδενοϊοί
Διαταραχές ανάπτυξης

Πίνακας 4. Παθήσεις που σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση.**AIDS**

Νευροεκφυλιστικές διαταραχές

Νόσος Alzheimer

Νόσος Parkinson

Νόσος Huntington

Μελαχρωματική αμφιβληστροειδοπάθεια

Παρεγκεφαλιδική εκφύλιση

Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Απλαστική αναιμία

Ισχαιμία

Έμφραγμα μυοκαρδίου

Εγκεφαλικό επεισόδιο

Ηπατική νόσος από τοξίνες

Αλκοόλ

Διαταραχές ανάπτυξης

Άλλες διαταραχές

Θυρεοειδίτιδα Hashimoto

Συστηματικός ερυθματώδης λύκος

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Ελκώδης κολίτιδα

Νόσος Wilson

Χρόνια ουδετεροπενία

Πίνακας 5. Γονίδια που ενέχονται στον αποπτωτικό μηχανισμό.**Επαγωγικά**

Γονίδια οικογένειας ICE

*ced-3, ced-4**fas, fas ligand**bax, bak, bok, bik**bcl-xS, bad, bid**bim, nip3, nix***Αναστολείς***ced-9**bcl-2, bcl-xL, bcl-w**mcl-1, ctmA, nrl-3***Παράγοντες μεταγραφής***p53**p21/waf**c-myc**c-fos**jun**cdc25*

εξωκυτάρια ή ενδοκυτάρια σήματα, (β) η ολοκλήρωση του κυτταρικού θανάτου μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών και (γ) η απομάκρυνση των διαλυμένων κυττάρων με φαγοκυττάρωση και η διάσπασή τους από τα λυσοσωματικά ένζυμα των φαγοκυττάρων.¹⁴

Ένα συγκεκριμένο αποπτωτικό σήμα μπορεί να τροποποιηθεί, να ενισχυθεί ή ακόμη και να ανασταλεί υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Πολλές ορμόνες (όπως π.χ. οι κυτταροκίνες και οι παράγοντες ανάπτυξης) δρουν ως γενικοί ή ειδικοί (για συγκεκριμένο ιστό) παράγοντες επιβίωσης, παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη της απόπτωσης. Αντίθετα, άλλοι ορμονικοί παράγοντες επάγουν ή ενισχύουν τις αποπτωτικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα τα γλυκοκορτικοειδή και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF (tumor necrosis factor).¹⁵

4.1. Γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση

Ο μεγάλος αριθμός των γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της απόπτωσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: (α) τα επαγωγικά, όπως η οικογένεια των γονιδίων ICE (interleukin-1β converting enzyme), που κωδικοποιούν το μετατρεπτικό ένζυμο ιντερλευκίνης-1β,¹⁶ τα γονίδια *ced-3, ced-4, bax, bcl-xS, bad* κ.ά., (β) τα ανασταλτικά, όπως τα *bcl-2, bcl-xL, bcl-w, nrl3* κ.ά. και (γ) οι παράγοντες μεταγραφής *c-myc, p53, p21/waf-1, c-fos, jun, cdc25* κ.ά. (πίν. 5).

Κεντρικό ρόλο στην απόπτωση παίζουν και τα γονίδια *fas* και *fas ligand*, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Fas και Fas ligand.²⁰ Μελέτες *in vivo* αλλά και *in vitro* έδειξαν συμμετοχή των πρωτεϊνών Fas/Fas ligand στην κλωνική εξάλειψη αυτοαντιδρώντων T-κυττάρων σε περιφερικά λεμφικά όργανα και στην εξάλειψη ενεργοποιημένων T-κυττάρων μετά από την αντίδρασή τους με ξένα αντιγόνα.²¹ Τελευταία, διαπιστώθηκε και η έκφραση των πρωτεϊνών Fas/Fas ligand και σε θυροειδικά κύτταρα και πιθανολογείται η συμμετοχή της οδού Fas στην παθογένεια αυτοάνοσων θυροειδικών αλλά και άλλων παθήσεων του ενδοκρινικού συστήματος.²²⁻²⁴

Από τους πιο σημαντικούς τελεστές (effectors) της απόπτωσης είναι και η οικογένεια γονιδίων ICE. Η πρωτεΐνη ICE εμφανίζει ομολογία με την πρωτεΐνη CED3 (cell death protein 3) του νηματοειδούς σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, από τη μελέτη του οποίου προέκυψαν οι περισσότερες γνώσεις μας πάνω στην απόπτωση. Όταν τα γονίδια *ced3* (cell death gene 3) ή *ced4* (cell death gene 4) του *C. elegans* απενεργοποιούνται, τα κύτταρα, που φυσιολογικά πεθαίνουν κατά την ανάπτυξη, επιβιώνουν.

Μπορούν τόσο να ενεργοποιήσουν όσο και να καταστείλουν τα προγράμματα θανάτου.

Η απόπτωση, όπως προκύπτει από τις μελέτες που έγιναν μέχρι σήμερα, επιτελείται σε τρία διαδοχικά στάδια. Αυτά είναι (α) ο προγραμματισμός σε θάνατο από

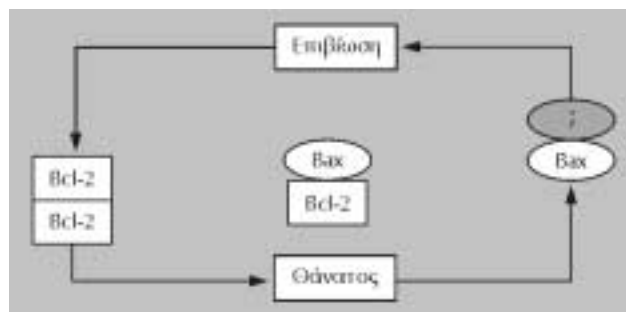
Η υπερέκφραση του γονιδίου *ICE* διαπιστώθηκε ότι προκαλεί απόπτωση ινοβλαστών και νευρικών κυττάρων. Η αποπτωτική δράση του γονιδίου *ICE* αναστέλλεται από την έκφραση του *bcl-2* και του γονιδίου *crmA* (cow-pox virus gene, cytokine response modifier A). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *crmA* είναι ειδικός αναστολέας της πρωτεΐνης ICE. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι, στην απόπτωση που παρατηρείται κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών, η πρωτεΐνη ICE παίζει παρόμοιο ρόλο με αυτόν της CED3 στην ανάπτυξη του *C. elegans*.²⁵⁻²⁷ Ένα δυνητικό υπόστρωμα για τις πρωτεάσες ICE/CED3, κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, είναι η πολυ-ADP-ριβο-πολυμεράση PARP (poly-ADP-ribose polymerase), ένζυμο που σχετίζεται με την επιδιόρθωση του DNA και την προστασία της ακεραιότητας του γονιδιώματος.²⁸ Η πρωτεόλυση του ενζύμου PARP από ένα ένζυμο της οικογένειας ICE έχει ως αποτέλεσμα τη μη επιδιόρθωση του DNA και την έναρξη της απόπτωσης.²⁹

Εκτός όμως από τα παραπάνω γονίδια, που η έκφρασή τους προκαλεί την ενεργοποίηση της απόπτωσης, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και γονίδια των οποίων η έκφραση αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, τα λεγόμενα *ανασταλτικά αποπτωτικά γονίδια*.

Στην κατηγορία αυτή, σημαντική θέση κατέχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2.^{30,31} Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 έχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και συσχετίζεται με την παθογένεια πολλών παθήσεων.

Μελέτες του γονιδίου *bcl-2* αποκάλυψαν ότι αλληλεπιδρά και με ένα άλλο γονίδιο, που ονομάζεται *bax* και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Bax (Bcl-2 associated x protein). Η πρωτεΐνη αυτή, η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών, σχηματίζει ετεροδιμερή με την Bcl-2 και η αναλογία των Bcl-2/Bax καθορίζει την επιβίωση των κυττάρων μετά από ένα αποπτωτικό ερέθισμα, όπως για παράδειγμα ύστερα από την ελάτωση ενός παράγοντα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, σε αναστολή της έκφρασης του γονιδίου *bcl-2*, η διέγερση της απόπτωσης απαιτεί την έκφραση του γονιδίου *bax*. Όταν όμως συνεκφράζονται τα γονίδια *bcl-2* και *bax*, η πρωτεΐνη Bax ενώνεται με την Bcl-2 και έτσι η δράση των γονιδίων αυτών εξουδετερώνεται στην απόπτωση. Η αποτυχία σύνδεσης της πρωτεΐνης Bax γύρω από την Bcl-2 προκαλεί την έναρξη της απόπτωσης, καθώς επίσης και τη δημιουργία Bax ομοδιμερών³² (εικ. 2).

Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* και το γονίδιο *p53* παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Το *c-myc* πιθα-



Εικόνα 2. Η πρωτεΐνη Bcl-2 ομοδιμερίζεται ή σχηματίζει ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Bax, με την οποία σχετίζονται στενά. Η αναλογία μεταξύ ομοδιμερών και ετεροδιμερών είναι αυτή που καθορίζει εάν τα κύτταρα θα εισέλθουν ή όχι στην αποπτωτική διαδικασία.

νότατα μπορεί να διεγείρει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση. Όμως, η επιλογή ενός κυττάρου για την είσοδο σε μία από τις δύο πορείες καθορίζεται από άλλα σήματα, όπως η παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου *c-myc* απαιτεί την παρουσία λειτουργικής πρωτεΐνης P53. Η συνεχής έκφραση του γονιδίου *c-myc* αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται από τις πρωτεΐνες θερμικού shock (heat shock proteins), την κυκλοεξίμηδη, καθώς και από μια σειρά αντικαρκινικών παραγόντων.¹⁷

Το γονίδιο *p53* χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό, γιατί η έκφρασή του και η παραγόμενη πρωτεΐνη P53 έχει την ικανότητα να διακόπτει τον πολλαπλασιασμό και να κατευθύνει το κύτταρο στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* είναι συχνές σε κάποιους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού. Ενώ ο φυσιολογικός τύπος της πρωτεΐνης P53 παρεμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη *in vitro*, είναι πιθανό ότι η P53 δεν επηρεάζει άμεσα την επαγωγή της απόπτωσης σε πολλά είδη κυττάρων.^{17,18} Μεταλλάξεις στο γονίδιο *p53* μπορούν να προκαλέσουν «αθανασία» των κυττάρων με παρεμπόδιση της απόπτωσης και τελικά τη δημιουργία όγκων. Η πρωτεΐνη P21/WAF αποδείχθηκε σημαντικός καθοδικός τελεστής (downstream effector) της P53 και πιθανός αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.¹⁹

4.2. Θετική και αρνητική επαγωγή της απόπτωσης

Υπάρχουν δύο κύριες οδοί που οδηγούν σε απόπτωση: (α) η *θετική επαγωγή* μέσω της σύνδεσης ενός υποκαταστάτη (ligand) σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και (β) η *αρνητική επαγωγή* με την απώλεια ενός κατασταλτικού σήματος.

Στην περίπτωση της αρνητικής επαγωγής της απόπτωσης, τα κύτταρα προγραμματίζονται να πεθάνουν όταν σταματούν να λαμβάνουν σήματα επιβίωσης από το περιβάλλον τους.³³ Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό, αφού εμποδίζει την ανάπτυξη κυττάρων εκτός της κατάλληλης γι' αυτά περιοχής και εξαλείφει κύτταρα με λειτουργίες που δεν συμβάλλουν στην επιβίωση του οργανισμού. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στους νευρώνες, οι οποίοι οδηγούνται αυτόματα σε απόπτωση όταν σταματούν να λαμβάνουν ηλεκτρικά ερεθίσματα ή όταν στερηθούν τους νευροτροφικούς παράγοντες.³⁴ Επίσης, εκτός από τα εξωκυττάρια σήματα, τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν και ενδοκυττάρια σήματα. Όταν συμβεί μια εσωτερική βλάβη, η οποία δεν είναι δυνατό να διορθωθεί, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Παρόμοιος μηχανισμός παρατηρείται και όταν λαμβάνει ταυτόχρονα αντιφατικά σήματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή διακοπή του κυτταρικού κύκλου.³³

Κατά τη θετική επαγωγή της απόπτωσης (instructive apoptosis), οι μηχανισμοί σημάτων οδηγούν το κύτταρο άμεσα στο θάνατο. Αυτό παρατηρείται κατά την εξάλειψη των ενεργοποιημένων περιφερικών T-κυττάρων στο τέλος μιας ανοσιακής αντίδρασης, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της ομοιότητας των λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια.³⁴

Η αρνητική επαγωγή της απόπτωσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία μετάδοσης σημάτων με πολλά στάδια, κατά τα οποία είναι απαραίτητη η σύνθεση πρωτεϊνών. Αντίθετα, η θετική επαγωγή απόπτωσης είναι άμεση και ενισχύεται με αναστολές της πρωτεϊνοσύνθεσης. Κεντρικό ρόλο παίζουν οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι λεγόμενοι «υποδοχείς θανάτου» (death re-

ceptors), οι οποίοι μεταδίδουν σήματα από ειδικούς υποκαταστάτες και ενεργοποιούν τον αποπτωτικό μηχανισμό των κασπασών.

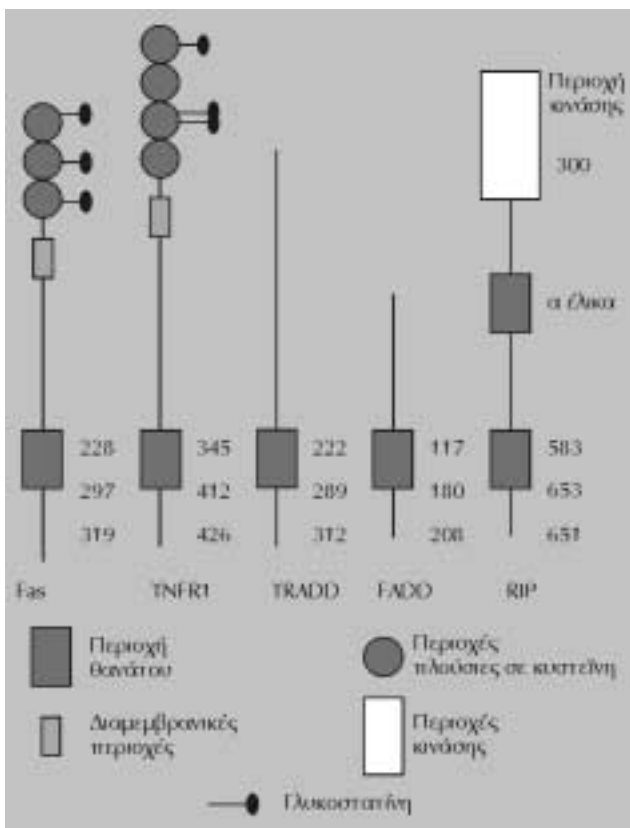
4.3. Υποδοχείς θανάτου (death receptors)

Οι υποδοχείς θανάτου που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα είναι μέλη της υπερικογένειας των γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF (tumor necrosis factor receptor) (πίν. 6). Τα μέλη της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την παρουσία παρόμοιων εξωκυττάρων περιοχών, που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη (εικ. 3). Επίσης, οι υποδοχείς θανάτου αποτελούν και μια υποομάδα στην υπερικογένεια υποδοχέων TNFR, με μια ομόλογη κυτταροπλασματική περιοχή 80 αμινοξέων, η οποία ονομάζεται «περιοχή θανάτου» DD ("death domain")³⁶ και συμμετέχει στην απόπτωση. Οι περιοχές θανάτου επιτρέπουν στους υποδοχείς θανάτου να συνδεθούν με τον αποπτωτικό μηχανισμό, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις είναι διαμεσολαβητές και σε λειτουργίες διαφορετικές από την απόπτωση, όπως στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor-κB). Είναι ακόμη γνωστό ότι κάποια μόρια-προσαρμοστές (adaptor molecules) περιέχουν και αυτά περιοχές θανάτου, προκειμένου να μεταβιβάζουν σήματα από τους υποδοχείς θανάτου.

Στη διεθνή βιβλιογραφία μέχρι σήμερα αναφέρονται οι υποδοχείς CD95/Fas/Apo1 και ο τύπου 1 υποδοχέας του TNF ή TNFR1 (TNF-receptor 1, αναφερόμενος και ως CD120a ή p55), ο DR3 (death receptor 3), ο οποίος αναφέρεται και ως Apo3, TRAMP, LARD ή WSL-1. Άλλοι τέτοιοι υποδοχείς είναι ο CAR1, ο DR4 (death re-

Πίνακας 6. Οι υποδοχείς της οικογένειας TNF και οι αντίστοιχοι υποκαταστάτες που συνδέονται με αυτούς.

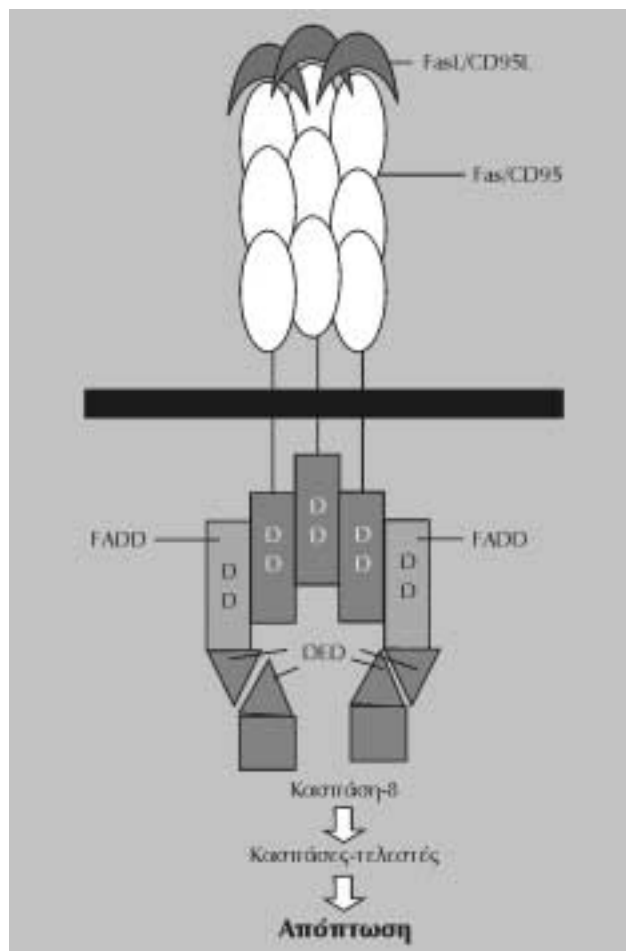
Υποδοχέας (receptor)	Άλλη ονομασία	Υποκαταστάτης (ligand)
Fas	CD95, APO-1	Fas ligand, CD95L, APO-1L
DR4	TRAIL-R1	TRAIL, APO-2L
DR5	TRAIL-R2	TRAIL, APO-2L
DR3	APO-3, WSL-1, TRAMP, LARD	APO-3L
DcR1	TRAIL-R3, TRID, LIT	TRAIL, APO-2L
DcR2	TRAIL-R4	TRAIL, APO-2L
TNFR1	-	TNFα, Lymphotoxin α
TNFR2	-	TNFα, Lymphotoxin α
LT-βR	-	Lymphotoxin β
CD40	-	CD40L, CD154, TRAP, gp39
CD30	-	CD30L
CD27	-	CD27L, CD70
NGF-R1	-	NGF



Εικόνα 3. Ο υποδοχέας Fas και άλλες πρωτεΐνες με περιοχές θανάτου. Η «περιοχή θανάτου» DD του υποδοχέα Fas/Apo1/CD95 βρέθηκε και στον υποδοχέα TNFR1, στο μόριο-προσαρμοστή FADD και στην πρωτεΐνη RIP. Το μόριο FADD συνδέεται με τον υποδοχέα Fas/Apo1 μέσω των ομολόγων περιοχών θανάτου.

ceptor 4, αναφερόμενος και ως TRAIL-R1) και ο DR5 (που αναφέρεται και ως Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 ή KILLER).³⁷

Ο ρόλος των υποδοχέων Fas, TNFR1 και DR3 είναι να μεταβιβάζουν τα αποπτωτικά σήματα μέσω του μόριου-προσαρμοστή FADD/Mort 1 (Fas-associated death domain), που περιέχει «περιοχή θανάτου» (εικ. 4). Ο υποδοχέας Fas συνδέεται στο FADD άμεσα, ενώ οι TNFR1 και DR3 συνδέονται μ' αυτό έμμεσα μέσω ενός άλλου μόριου-προσαρμοστή που λέγεται TRADD (TNF-receptor-associated death domain) (εικ. 4). Επίσης, ο FADD περιέχει μια περιοχή θανάτου "death effector domain" (DED), που συνδέεται με ανάλογη περιοχή της προκασπάσης-8. Ύστερα από τη μετάδοση του σήματος μέσω του FADD, ο ολιγομερισμός της κασπάσης-8, που είναι γνωστή και ως FLICE (FADD-like ICE) ή MACH, οδηγεί στην ενεργοποίησή της μέσω αυτοδιάσπασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κασπάση-8 να ενεργοποιεί άλλες κασπάσες-τελεστές, όπως την κασπά-



Εικόνα 4. Η επαγωγή απόπτωσης μέσω του υποδοχέα Fas/CD95. Μετά τη σύνδεση του Fas ligand/CD95L με τον υποδοχέα Fas/CD95 και τον τριμερισμό του Fas, το αποπτωτικό σήμα μεταβιβάζεται μέσω του μόριου-προσαρμοστή FADD στην προκασπάση-8. Αυτή κατά την ενεργοποίησή της μετατρέπεται σε κασπάση-8 και ενεργοποιεί άλλες κασπάσες-τελεστές, που οδηγούν τελικά το κύτταρο σε απόπτωση (τροποποιημένο από βιβλιογραφική αναφορά 37).

ση-9, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση. Μελέτες σε επίμυες, που δεν διαθέτουν το γονίδιο *FADD*, έδειξαν ότι αυτό το μόριο-προσαρμοστής είναι απαραίτητο για την επαγωγή της απόπτωσης μέσω των Fas, TNFR1 και DR3.³⁷

4.3.1. Μετάδοση σημάτων μέσω του υποδοχέα CD95/Fas. Οι υποδοχείς Fas και FasL παίζουν σημαντικό ρόλο, κυρίως σε τρεις τύπους φυσιολογικής απόπτωσης: (α) στην περιφερική εξάλειψη ενεργοποιημένων ώριμων Τ-κυττάρων κατά τη λήξη μιας ανοσιακής αντίδρασης, (β) στην καταστροφή κυττάρων-«στόχων» (όπως κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή καρκινικά κύτταρα) μέσω των Τ-κυτταροτοξικών κυττάρων και των κυττάρων-φυσικών φονέων (NK) και (γ) στην εξάλειψη κυττάρων

φλεγμονής σε ανοσολογικά προνομιακούς ιστούς (immune-privileged), όπως είναι οι ιστοί των οφθαλμών και των όρχεων.

Παρόλο που αρχικά εθεωρείτο ότι ο FasL είναι ειδικός για τους λεμφικούς ιστούς, οι έρευνες έδειξαν τη συνεχή έκφρασή του και σε ποικιλία μη λεμφικών ιστών, όπως η καρδιά και το πάγκρεας.³⁸

Σε επίμυες αλλά και ανθρώπους με ελλείμματα των υποδοχέων Fas και FasL παρατηρήθηκε συσώρευση περιφερικών λεμφοκυττάρων και ένα θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο με μαζική διόγκωση λεμφαδένων. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η έκφραση του FasL σε κύτταρα όγκων προκάλεσε την εξάλειψη Fas-θετικών κυταροτοξικών κυττάρων.³⁹

Μια οικογένεια ιικών πρωτεϊνών, οι λεγόμενες vFLIPs (viral FLICE inhibitory proteins), και μια σχετιζόμενη με αυτές κυτταρική πρωτεΐνη, που λέγεται FLIP (γνωστή και ως Casper, I-FLICE, FLAME-1, CASH ή CLARP), περιέχουν μια περιοχή “death effector domain”, που εμφανίζει ομοιότητες με την αντίστοιχη περιοχή των FADD και της κασπάσης-8. Ο ρόλος της FLIP είναι αντιφατικός, καθώς η υπερέκφρασή της άλλοτε αναστέλλει και άλλοτε ενεργοποιεί την απόπτωση.⁴⁰ Εκτός από τη FADD υπάρχουν και άλλες κυταροπλασματικές πρωτεΐνες, που αναγνωρίζουν την περιοχή θανάτου DD του υποδοχέα Fas και συνδέονται μ’ αυτήν, όπως η πρωτεΐνη Daxx, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει μια οδό θανάτου ανεξάρτητη από το μόριο FADD. Όμως, σε ορισμένους τύπους κυττάρων με έλλειψη FADD παρατηρείται πλήρης ανθεκτικότητα στη Fas-επαγόμενη απόπτωση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, σε κάποιους τύπους κυττάρων, η πρωτεΐνη Daxx δεν οδηγεί σε απόπτωση όταν συνδέεται με τον υποδοχέα Fas.⁴¹

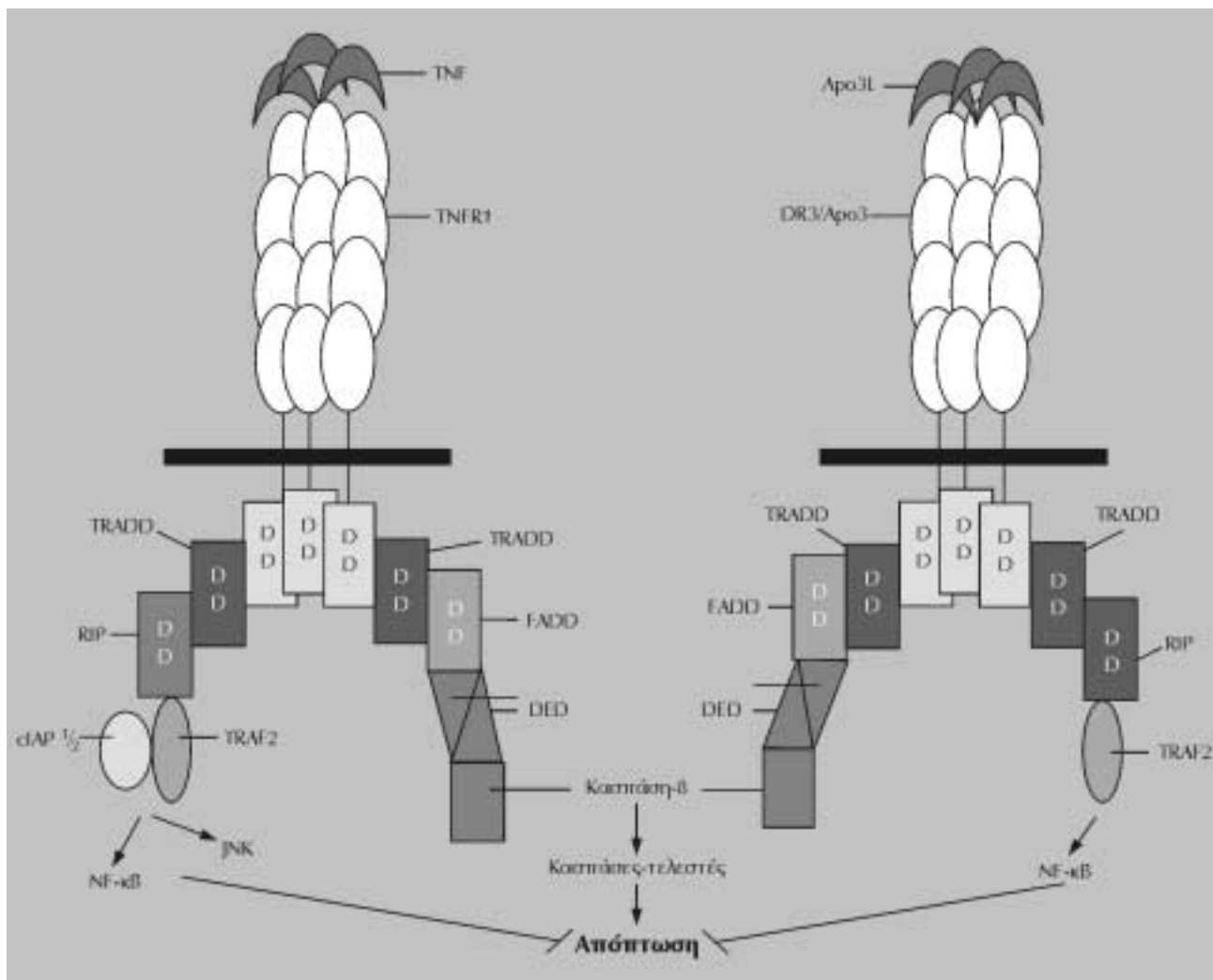
4.3.2. Μετάδοση σημάτων μέσω του υποδοχέα TNFR1. Ο παράγοντας TNF, ως αντίδραση στη φλεγμονή, παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και Τ-λεμφοκύτταρα.⁴² Με τη σύνδεσή του στον TNFR1 (μοριακό βάρος, MB≈55 kDa) ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κΒ και AP-1, οι οποίοι, με τη σειρά τους, επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών γονιδίων.⁴² Η σύνδεση όμως των TNF και TNFR1 σε κάποια κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, γεγονός το οποίο παρατηρείται σπάνια όταν αναστέλλεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι προϋπάρχουν κυτταρικοί παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να καταστείλουν το αποπτωτικό ερέθισμα που πυροδοτείται από τον TNF. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η έκφραση τέτοιων κατασταλτικών πρωτεϊνών ελέγχεται μέ-

σω των παραγόντων NF-κΒ και JNK/AP-1 (c-Jun N-terminal kinase), καθώς η αναστολή των οδών αυτών ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω του TNF.⁴³

Ο TNF προκαλεί τον τριμερισμό του TNFR1 μετά τη σύνδεσή του σ’ αυτόν,⁴⁴ με αποτέλεσμα τη σύνδεση των «περιοχών θανάτου» των υποδοχέων. Στη συνέχεια, το μόριο TRADD συνδέεται με τη δική του «περιοχή θανάτου» (DD), λειτουργώντας ως διαμεσολαβητής μεταξύ του ενεργοποιημένου υποδοχέα και των σηματοδοτικών μορίων.³⁷ Ο παράγοντας TRAF2 (TNFR-associated factor-2), με μοριακό βάρος 75 kDa, συνδεόμενος με τον TNFR1 και την πρωτεΐνη RIP (receptor-interacting protein), η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα, πυροδοτεί οδούς σημάτων, οι οποίες οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και JNK/AP-1, ενώ το μόριο FADD οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση.^{45,46} Επίσης, είναι γνωστό ότι ο TRAF2 συνδέεται και με τις πρωτεΐνες cIAP-1 και cIAP-2 (cellular inhibitor of apoptosis protein-1 and -2), οι οποίες ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών θηλαστικών και ιών που εμφανίζουν αντι-αποπτωτική δραστηριότητα⁴⁷ (εικ. 5).

Το μόριο FADD συνδέει το σύμπλεγμα TNFR1-TRADD με την κασπάση-8, οδηγώντας το κύτταρο τελικά σε απόπτωση. Εκτός από το FADD, ο TNFR1 μπορεί να συνδεθεί και με ένα άλλο μόριο-προσαρμοστή, που αναφέρεται ως RAIDD (RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain) ή CRADD (caspase and RIP adaptor with death domain). Το μόριο αυτό συνδέεται με την περιοχή θανάτου (DD) που διαθέτει, στην περιοχή θανάτου της πρωτεΐνης RIP και σε ανάλογη περιοχή της κασπάσης-2, επάγοντας με αυτή την τριπλή σύνδεση τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.⁴⁸

4.3.3. Μετάδοση σημάτων μέσω DR3. Ο υποδοχέας DR3, ο οποίος εμφανίζει μεγάλη δομική ομοιότητα με τον TNFR1,³⁷ πυροδοτεί κατά την υπερέκφρασή του αντιδράσεις παρόμοιες με τον TNFR1, όπως την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ και την απόπτωση. Όπως και ο TNFR1, έτσι και ο DR3, μετά τη σύνδεσή του με τον υποκαταστάτη Aro3L, είτε ενεργοποιεί τον NF-κΒ, μέσω της σύνδεσης με τα μόρια TRADD, TRAF2 (TNF-receptor associated factor-2) και RIP, είτε πυροδοτεί την απόπτωση μέσω των TRADD, FADD και κασπάσης-8. Ο υποκαταστάτης Aro3L εμφανίζει δομική ομοιότητα με τον TNF,⁴⁹ αν και υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στην έκφραση αυτών των δύο και των αντίστοιχων υποδοχέων με τους οποίους συνδέονται. Για παράδειγμα, ο TNF εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιη-



Εικόνα 5. Η μεταγωγή προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών σημάτων μέσω των υποδοχέων TNFR1 και DR3. Μετά τη σύνδεση του TNF στον υποδοχέα TNFR1, ακολουθεί σύνδεση του μορίου-προσαρμοστή TRADD στον υποδοχέα μέσω της δικής του περιοχής θανάτου DD. Όταν το μόριο TRADD συνδέεται με το μόριο FADD, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Μπορεί, όμως, να γίνει σύνδεση του μορίου TRADD με την πρωτεΐνη RIP και τον παράγοντα TRAF2, που οδηγεί στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και JNK (τροποποιημένο από βιβλιογραφική αναφορά 37).

μένα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα,⁴² ενώ ο Apo3L εκφράζεται σε πολλούς ιστούς.³⁷ Όμως, παρά την αλληλοεπικάλυψη των μηχανισμών μετάδοσης των αποπτωτικών σημάτων, οι αλληλεπιδράσεις Apo3L-DR3 και TNF-TNFR1 έχουν πιθανότητα διαφορετικούς ρόλους.

4.3.4 Μετάδοση σημάτων μέσω DR4 και DR5. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε, από δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών, κι άλλο ένα μέλος της οικογένειας TNF, με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ως προς τον FasL, ο υποκαταστάτης Apo2L ή TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Όπως και ο FasL, ο υποκαταστάτης Apo2L πυροδοτεί ταχέως την απόπτωση σε πολλές κυτταρικές σειρές.⁵⁰ Αν και ο υποδοχέας Fas εκφράζεται

κυρίως σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα και NK-κύτταρα, έχει διαπιστωθεί η συνεχής έκφραση του μορίου Apo2L σε πολλούς ιστούς, καθώς και η αύξηση της έκφρασής του κατά τον ίδιο τρόπο με τον υποδοχέα Fas, μετά από διέγερση των περιφερικών T-λεμφοκυττάρων του αίματος.⁴⁸ Μια υποομάδα των T-κυττάρων αποκτά ευαισθησία στην Apo2L-επαγόμενη απόπτωση ύστερα από διέγερση μέσω της ιντερλευκίνης-2 (IL-2). Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο Apo2L παίζει ρόλο στην εξάλειψη των περιφερικών T-κυττάρων.⁵¹

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο νέοι υποδοχείς της οικογένειας TNF, οι DR4 και DR5, στους οποίους συνδέεται ο υποκαταστάτης Apo2L. Όταν οι υποδοχείς αυτοί υ-

πerekφράζονται, πυροδοτούν την απόπτωση μέσω μιας οδού ανεξάρτητης του FADD, αλλά εξαρτώμενης από τις κασπάσες.³⁷

Έχει διαπιστωθεί, όμως, και η ύπαρξη μηχανισμών που προστατεύουν τα κύτταρα από την επαγωγή της απόπτωσης μέσω του υποκαταστάτη Apo2L. Μια μορφή προστασίας βασίζεται στη μοναδική ομάδα των λεγόμενων υποδοχέων «παγίδων» “Decoy Receptors” (DcRs), οι οποίοι ανταγωνίζονται τους DR4 και DR5 στη σύνδεσή τους με τον Apo2L.⁵² Ο υποδοχέας DcR1 (που λέγεται και TRID, TRAIL-R3 ή LIT) είναι μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας παρόμοια με τους DR4 και DR5, η οποία όμως στερείται της κυτταροπλασματικής περιοχής αυτών των υποδοχέων.³⁷ Ο υποδοχέας αυτός φαίνεται να λειτουργεί ως «παγίδα-ασφαλιστική δικλείδα», που εμποδίζει το μόριο Apo2L να συνδεθεί με τους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου. Ο υποδοχέας DcR2 (που λέγεται και TRAIL-R4 ή TRUNDD)⁵³ είναι ανάλογος με τους υποδοχείς DR4 και DR5, αλλά διαθέτει μια κυτταροπλασματική περιοχή που μοιάζει με τις περιοχές θανάτου και έχει μήκος ίσο με το ένα τρίτο του μήκους μιας περιοχής θανάτου DD. Ο υποδοχέας DcR2 δεν διαθέτει τις τέσσερις από τις έξι θέσεις αμινοξέων που είναι απαραίτητες για την απόπτωση και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ μέσω του υποδοχέα TNFR1.³⁶ Φαίνεται, όμως, ότι και αυτός λειτουργεί ως «παγίδα», που ανταγωνίζεται με τους υποδοχείς DR4 και DR5 για τη σύνδεσή του με το μόριο Apo2L.

Όλα τα γονίδια, που κωδικοποιούν τους υποδοχείς DR4, DR5, DcR1 και DcR2, έχουν χαρτογραφηθεί στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 8p21-22, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι προέρχονται όλα από ένα κοινό αρχέγονο γονίδιο.⁵³

4.4. Κασπάσες (caspases)

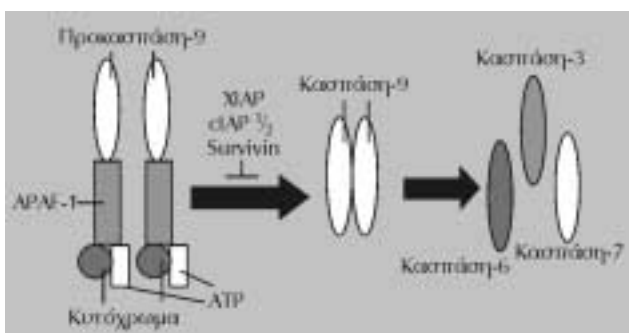
Κύριο συστατικό του αποπτωτικού μηχανισμού στα θηλαστικά είναι η οικογένεια πρωτεασών που ονομάζονται *κασπάσες*. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση, που πυροδοτείται από προαποπτωτικά σήματα και οδηγεί στην κατάτμηση του DNA και στη διάλυση του κυτάρου. Επειδή γνωρίζουμε πολύ λίγα για τη ρύθμιση των κασπασών, η μελέτη ήδη γνωστών πρωτεολυτικών συστημάτων μπορεί να μας προσφέρει πολλά στοιχεία.

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των κασπασών, το οποίο ταυτοποιήθηκε, είναι η πρωτεΐνη ICE ή κασπάση-1. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 κασπάσες θηλαστικών με διαφορετικούς ρόλους στη φλεγμονή και στην απόπτωση⁵⁴ (πίν. 7).

Στην απόπτωση, οι κασπάσες λειτουργούν είτε ως εναρκτές (“initiators”), είτε ως τελεστές (“effectors”) της διαδικασίας διάλυσης του κυτάρου ως απάντηση σε προαποπτωτικά σήματα (εικ. 6). Όπως και οι άλλες πρωτεάσες, οι κασπάσες συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα και διαθέτουν 3 περιοχές: (α) ένα αμινοτελικό άκρο

Πίνακας 7. Οι κασπάσες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα.

Όνομα	Άλλες ονομασίες	Λειτουργία	Μοριακό βάρος (kDa)
Κασπάση-1	ICE	Φλεγμονή	45
Κασπάση-2	ICH-1, Nedd-2	Τελεστής απόπτωσης	51
Κασπάση-3	CPP32, Yama, apopain, SCA-1, LICE	Τελεστής	32
Κασπάση-4	TX, ICH-2, ICErel-II	Τελεστής	43
Κασπάση-5	TY, ICErel-III	Τελεστής	48
Κασπάση-6	Mch2	Τελεστής	34
Κασπάση-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Τελεστής	35
Κασπάση-8	FLICE, MACH, Mch5	Εναρκτής	55
Κασπάση-9	ICE-LAP6, Mch6	Εναρκτής	46
Κασπάση-10	FLICE-2, Mch4	Εναρκτής	55
Κασπάση-11	mICH-3, mCASP-11	Φλεγμονή, τελεστής απόπτωσης	43
Κασπάση-12	mICH-4, mCASP-12	Τελεστής	50
Κασπάση-13	ERICE	Τελεστής	43
Κασπάση-14	MICE	Τελεστής	30



Εικόνα 6. Η ενεργοποίηση κασπασών και οι πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης. Η προκασπάση-9 ενεργοποιείται μετά από το σχηματισμό συμπλέγματος με τον παράγοντα APAF-1 και το κυτόχρωμα c. Η κασπάση-9, στη συνέχεια, μπορεί να ενεργοποιήσει επιπρόσθετες κασπάσες (π.χ. -3, -6, -7) μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης. Οι πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης XIAP, cIAP-1, cIAP-2 και survivin μπορούν να αποτρέψουν την πρωτεολυτική διάσπαση των προ-κασπασών -3, -6 και -7 αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-9, η οποία επιτυγχάνεται μέσω του κυτοχρώματος c.

(NH₂), που ποικίλλει στο μήκος (από 23 έως 216 αμινοξέα) και την αλληλουχία των αμινοξέων του και το οποίο σχετίζεται με την ενεργοποίηση των προενζύμων, (β) μια μεγάλη υποομάδα (MB≈20 kDa) και (γ) μια μικρή υποομάδα (MB≈10 kDa). Η ενεργοποίηση των προενζύμων οδηγεί σε συνένωση της μεγάλης και της μικρής υποομάδας, οι οποίες σχηματίζουν μ' αυτόν τον τρόπο ένα ετεροδιμερές. Από τη μελέτη των κασπασών -1 και -3 προκύπτει ότι δύο διμερή συνενώνονται και σχηματίζουν ένα τετραμερές με δύο καταλυτικές περιοχές, οι οποίες φαίνονται να λειτουργούν ανεξάρτητα μεταξύ τους.^{55,56}

Οι κασπάσες είναι από τις πιο ειδικές πρωτεάσες. Απαραίτητη προϋπόθεση για επαρκή κατάλυση είναι η αναγνώριση τεσσάρων τουλάχιστον αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής διάσπασης. Η τετραπεπτιδική κωροδιάταξη, η οποία αναγνωρίζεται, είναι διαφορετική για τους διάφορους τύπους κασπασών. Το γεγονός αυτό εξηγεί την ποικιλομορφία των βιολογικών τους λειτουργιών.⁵⁷ Επιπλέον, δεν διασπώνται όλες οι πρωτεΐνες με το συγκεκριμένο τετραπεπτίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι στοιχεία τεταρτοταγούς δομής επηρεάζουν την αναγνώριση.

Η υψηλή ειδικότητα των κασπασών συμφωνεί με την παρατήρηση ότι στην απόπτωση δεν επισυμβαίνει αδιάκριτη πέψη πρωτεϊνών. Αντίθετα, επιλεγμένη ομάδα πρωτεϊνών διασπάται με συντονισμένο τρόπο, συνήθως σε μία μόνο περιοχή, κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή μεταβολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Με βάση την ειδικότητα ενζύμου-υποστρώματος, οι κασπά-

σες διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Μέλη της πρώτης ομάδας (I) είναι οι κασπάσες -1, -4 και -5, που έχουν προτίμηση σε υποστρώματα με την αλληλουχία αμινοξέων WEHD (Try-Glu-His-Asp). Μέλη της δεύτερης ομάδας (II) είναι οι κασπάσες -2, -3, -7 και CED-3, οι οποίες προτιμούν την αλληλουχία DEXD (Asp-Glu-X-Asp), με απόλυτη απαίτηση την παρουσία ενός ασπαρτικού (D) αμινοξέος στη θέση P4. Τα μέλη της τρίτης ομάδας (III) είναι οι κασπάσες -6, -8, -9 και το "aspase" granzyme B, που αναγνωρίζουν αλληλουχίες (I/L/V) EXD (Glu-X-Asp). Σύμφωνα με τα ερευνητικά δεδομένα, φαίνεται ότι οι κασπάσες της ομάδας I ενέχονται πρωταρχικά στη φλεγμονή, ενώ αυτές της ομάδας II και της ομάδας III είναι σημαντικές για τη μετάδοση σημάτων και την επιτέλεση της απόπτωσης.⁵⁴

4.4.1. Τρόπος δράσης των κασπασών. Δεν είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχουν οι κασπάσες στην απόπτωση.^{58,59}

Ένας τρόπος δράσης των κασπασών είναι η *απενεργοποίηση των πρωτεϊνών που προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση*. Παράδειγμα αποτελεί ο παράγοντας ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase), ο οποίος είναι αναστολέας της νουκλεάσης CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), που είναι υπεύθυνη για την κατάτμηση του DNA. Για την ενεργοποίηση αλλά και την αναστολή της πρωτεΐνης CAD απαιτείται η παρουσία του ICAD. Σε μη αποπτωτικά κύτταρα, η CAD είναι παρούσα ως ανενεργό σύμπλεγμα με τον παράγοντα ICAD. Κατά την απόπτωση, ο ICAD απενεργοποιείται από τις κασπάσες αφήνοντας την πρωτεΐνη CAD ελεύθερη να δράσει ως νουκλεάση.^{60,61}

Άλλος τρόπος δράσης των κασπασών είναι η *άμεση καταστροφή* κυτταρικών σκελετών, όπως η πυρηνική lamina,^{62,63} που βρίσκεται κάτω από την πυρηνική μεμβράνη και συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης. Κατά την απόπτωση, οι κασπάσες διασπούν τις λαμίνες (πρωτεΐνες που αποτελούν τη lamina), με αποτέλεσμα την καταστροφή της lamina και τη συμπύκνωση της χρωματίνης.

Επιπλέον, οι κασπάσες *απορρυθμίζουν τη δράση των πρωτεϊνών* με διαχωρισμό των ρυθμιστικών και καταλυτικών περιοχών τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή την απόκτηση κάποιας πρωτεϊνικής λειτουργίας. Παράδειγμα αποτελεί η απορρύθμιση της δράσης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA (όπως η DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase catalytic site), στην ωρίμανση του mRNA (όπως η U1-70K) και στην αντιγραφή του DNA (όπως ο παράγοντας αντιγραφής C).^{59,64} Παρόλο που η σχέση αυ-

τών των διασπάσεων με τον κυτταρικό θάνατο δεν είναι πλήρως κατανοητή, είναι πιθανό η δυσλειτουργία των ομοιοστατικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών να διευκολύνει τη διάλυση του κυττάρου.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι κασπάσες συμμετέχουν στην απόπτωση με έναν τρόπο καλά οργανωμένης «στρατιωτικής επιχείρησης». Διακόπτουν τις συνδέσεις με γειτονικά κύτταρα, αναδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό, σταματούν την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, διακόπτουν το μάτισμα του RNA (splicing), καταστρέφουν το DNA και τον πυρηνικό σκελετό. Επίσης, προκαλούν την αποστολή σημάτων από τα κύτταρα, με κατάληξη τη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων και τη φαγοκυττάρωση.

4.4.2. Ρύθμιση των κασπασών. Η πολυπλοκότητα της ρύθμισης των κασπασών μπορεί να συναγωνιστεί αυτήν των συστημάτων πήξης και του συμπληρώματος.

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα γενετικά και βιοχημικά στοιχεία, ένα προαποπτωτικό σήμα οδηγεί σε ενεργοποίηση μιας κασπάσης-εναρκτή, που με τη σειρά της ενεργοποιεί κασπάσες-τελεστές και προκαλείται καταστροφή του κυττάρου. Οι διάφορες κασπάσες-εναρκτές ενεργοποιούνται από διαφορετικές ομάδες σημάτων. Για παράδειγμα, η κασπάση-8 σχετίζεται με την απόπτωση που αφορά υποδοχείς θανάτου (death receptors),³⁷ ενώ, αντίθετα, η κασπάση-9 σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από κυτταροτοξικούς παράγοντες.⁶⁵ Αυτό εξηγεί πώς ξεχωριστά αποπτωτικά σήματα επάγουν τις ίδιες βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές.

Η ενεργοποίηση των κασπασών-εναρκτών απαιτεί τη σύνδεσή τους με ειδικούς συμπαράγοντες (cofactors), κάτι που παρατηρείται γενικά στις πρωτεάσες. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 προϋποθέτει τη σύνδεσή της με το συμπαράγοντά της FADD μέσω της περιοχής DED.⁶⁶ Η ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 προϋποθέτει τη σύνδεσή της με το συμπαράγοντα APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1),⁶⁷ επιπλέον, όμως, απαιτούνται και το κυτόχρωμα c και ATP (εικ. 6).

Στην απόπτωση μέσω Fas και TNFR1 σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα μετάδοσης αποπτωτικών σημάτων, γνωστό ως DISC (death-inducing signaling complex), το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 και, στη συνέχεια, των κασπασών -3, -6 και -7.⁶⁸ Τελευταία, διαπιστώθηκε ένα νέο μέλος του συμπλέγματος αυτού, που ονομάζεται FLASH (FLICE-associated huge protein) και αλληλεπιδρά με την περιοχή DED της κασπάσης-8. Επίσης, προσφάτως ταυτοποιήθηκε και μια

νέα ομάδα πρωτεϊνών, οι FLIPs (FLICE inhibitory proteins), οι οποίες δεσμεύουν το σχηματισμό του συμπλέγματος DISC μέσω του Fas ή του TNF-α και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8.⁴⁰

Ο σημαντικότερος ρόλος των κασπασών-εναρκτών στην πρωτεολυτική αλυσιδωτή αντίδραση γίνεται ακόμα πιο εμφανής από το γεγονός ότι οι εναρκτές μπορούν να προκαλέσουν όχι μόνο ενεργοποίηση καθοδικών κασπασών-τελεστών, αλλά και αυτοενεργοποίηση. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι οι περιοχές αναγνώρισης για τη διάσπαση βρίσκονται και στις δικές τους αλληλουχίες και στις κασπάσες-τελεστές. Για παράδειγμα, η προτιμώμενη περιοχή αναγνώρισης της εναρκτού-κασπάσης-8 είναι παρούσα και στην προκασπάση-8, όπως και στις τελεστές-προκασπάσες -3 και -7. Αντίθετα, οι κασπάσες-τελεστές δεν έχουν την ικανότητα αυτοκατάλυσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, από τη στιγμή που ξεκινάει η αλυσιδωτή αντίδραση των παραπάνω ενζύμων, η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου δεν είναι αναστρέψιμη.⁵⁴

Η έρευνα οδήγησε στην ταυτοποίηση των αναστολέων των κασπασών από ιούς, οι οποίοι χρησιμοποιούν τους αναστολείς για να εμποδίζουν τη φυσιολογική αντίδραση του κυττάρου-ξενιστή στη μόλυνση. Από τις πρωτεΐνες-αναστολείς που ταυτοποιήθηκαν, όπως οι CrmA, P35 και οι IAPs, μόνο οι πρωτεΐνες IAPs είναι γνωστό ότι έχουν μέλη της ίδιας οικογένειας σε θηλαστικά. Σε αναλογία με άλλα πρωτεολυτικά συστήματα, οι αναστολείς καθορίζουν τη συγκέντρωση των ενεργών κασπασών-τελεστών που απαιτούνται για την αποδιοργάνωση του κυττάρου και προλαβαίνουν τις συνέπειες της τυχαίας ή στιγμιαίας ενεργοποίησης των προενζύμων.

Ο τρόπος, όμως, με τον οποίο οι IAPs και οι άλλοι αναστολείς των κασπασών σχετίζονται με την απόπτωση δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος.^{69,72} Οι πρωτεΐνες IAPs έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά: ένα έως τρία BIR (Baculovirus IAP repeat motif) και μια καρβοξυτελική περιοχή με δακτύλιο ψευδαργύρου RING (really interesting new gene), που εμπλέκονται σε διάφορα νοσήματα του ανθρώπου. Για παράδειγμα, η έκφραση της survivin, ενός ομολόγου των IAPs στον άνθρωπο, συνδέεται με ελαττωμένη απόπτωση και δημιουργία όγκων.⁷³ Οι μεταλλάξεις αδρανισμού της πρωτεΐνης NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) συμβάλλουν στην παθολογία της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας (spinal muscular atrophy, SMA), προκαλώντας εκτεταμένη απόπτωση νευρώνων,⁷⁴ ενώ η υπερέκφραση της NAIP ελαττώνει τον ισχαιμικό θάνατο των νευρώνων.⁷⁴⁻⁷⁶

4.5. Μιτοχόνδρια

Πολλά από τα γεγονότα-κλειδιά της απόπτωσης, όπως η απελευθέρωση ενεργοποιητών των κασπασών (π.χ. κυτόχρωμα c), οι μεταβολές στη μεταφορά ηλεκτρονίων, η απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, η τροποποίηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγής και η συμμετοχή προ- και αντιαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια. Αν και η απόπτωση είναι ανεξάρτητη της οξειδωτικής φωσφορύλισης (δεν απαιτεί την ύπαρξη μιτοχονδριακού DNA), έχει αναγνωριστεί πλέον σε πολλά συστήματα ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων σ' αυτή τη διαδικασία.⁷⁷

Στην οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 υπάρχουν αντιαποπτωτικά μέλη που συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων, αλλά και προαποπτωτικά, όπως η πρωτεΐνη Bax, που μπορούν να προκαλέσουν μιτοχονδριακή καταστροφή και κυτταρικό θάνατο, ακόμα κι όταν οι κασπάσες είναι απενεργοποιημένες.⁷⁸ Αυτές οι ερευνητικές παρατηρήσεις δημιουργούν το ερώτημα εάν υπάρχει ένας μηχανισμός, ανεξάρτητος των κασπασών, που να συνδέεται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Σ' αυτόν το μηχανισμό φαίνεται ότι εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια.

Είναι γνωστοί τουλάχιστον τρεις γενικοί μηχανισμοί πυροδότησης κυτταρικού θανάτου από τα μιτοχόνδρια, που πιθανόν σχετίζονται μεταξύ τους: (α) η διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων, της οξειδωτικής φωσφορύλισης και της παραγωγής ATP, (β) η απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τις κασπάσες και (γ) η μετατροπή του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής.

4.5.1. Διακοπή μεταφοράς ηλεκτρονίων και ενεργειακού μεταβολισμού. Πριν από δεκαετίες, η διακοπή μεταφοράς ηλεκτρονίων αναγνωρίστηκε ως πρώιμο χαρακτηριστικό κυτταρικού θανάτου. Για παράδειγμα, η γακτινοβολία επάγει την απόπτωση σε θυμοκύτταρα και διακόπτει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, πιθανόν στη θέση κυτόχρωμα b-c1/κυτόχρωμα c (cyto c).⁷⁹ Η απώλεια μεταφοράς ηλεκτρονίων θα μπορούσε να έχει ως συνέπεια τη μείωση της παραγωγής ATP. Τέτοια μείωση παρατηρήθηκε κατά την απόπτωση, αλλά εμφανίζεται σε σχετικά όψιμα στάδια.⁸⁰ Στην πραγματικότητα, η μείωση του ATP φαίνεται ότι αποτελεί προϋπόθεση για την τέλεση της απόπτωσης.⁸¹ Όμως, αν και η μείωση της παραγωγής ATP στα μιτοχόνδρια μπορεί να «θανατώσει» ένα κύτταρο, θεωρείται απίθανο να είναι αυτός ο μηχανισμός επαγωγής της απόπτωσης.

4.5.2. Απελευθέρωση πρωτεϊνών ενεργοποίησης των κασπασών. Μελέτες σε ακυτταρικά συστήματα έδειξαν ότι η συμπύκνωση του πυρήνα και η κατάτμηση του DNA

εξαρτώνταν από την παρουσία μιτοχονδρίων,⁸² καθώς επίσης και ότι η επαγωγή της ενεργοποίησης κασπασών με προσθήκη ATP εξαρτάτο από την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια κατά την προετοιμασία των εκκυλισμάτων.⁸³

Πολλαπλά ερεθίσματα, όπως η πρωτεΐνη Bax, η υπερφόρτωση με Ca⁺⁺ και οι ενεργοποιημένες κασπάσες, μπορούν να ωθήσουν τα μιτοχόνδρια σε απελευθέρωση πρωτεϊνών, οι οποίες ενεργοποιούν και άλλες κασπάσες. Μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών περιλαμβάνονται το κυτόχρωμα c, ο παράγοντας AIF (apoptosis-inducing factor) και ενδομιτοχονδριακές κασπάσες.

Έχουν προταθεί δύο γενικοί μηχανισμοί απελευθέρωσης τέτοιων πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια: (α) η διαταραχή της οσμωτικής ισορροπίας, το οίδημα του μιτοχονδρίου και η επακόλουθη ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης και (β) η διάνοιξη διαύλων στην εξωτερική μεμβράνη (χωρίς οίδημα του οργανιδίου), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα.

Το κυτόχρωμα c, συνδεδεμένο με τον παράγοντα APAF-1, ενεργοποιεί τις κασπάσες και προκαλεί τη συνένωση του APAF-1 με την προκασπάση-9.⁶⁷ Κατ' αυτόν τον τρόπο πυροδοτείται η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και η έναρξη της πρωτεολυτικής αντίδρασης-καταρράκτη (cascade) των κασπασών, που οδηγεί στην απόπτωση.

Είναι αξιοσημείωτο το ότι οι αναστολείς των κασπασών δεν εμποδίζουν την απελευθέρωση κυτοχρώματος c, που επάγεται από διάφορους αποπτωτικούς παράγοντες, όπως η UV ακτινοβολία ή η υπερέκφραση του γονιδίου bax.^{80,84} Η απελευθέρωση κυτοχρώματος c «καταδικάζει» το κύτταρο σε θάνατο είτε με ένα γρήγορο αποπτωτικό μηχανισμό (ενεργοποίηση των κασπασών μέσω APAF-1), είτε με μια βραδύτερη νεκρωτική διαδικασία λόγω διακοπής της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της μείωσης του ATP.

Οι συνέπειες της απελευθέρωσης κυτοχρώματος c πιθανόν να εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο. Στα κύτταρα με αφθονία κυτοχρώματος c μπορεί να γίνει ενεργοποίηση των κασπασών και να συνεχιστεί η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ATP, ενώ οι κασπάσες οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. Σε κύτταρα, όμως, που περιέχουν μεγάλες ποσότητες ενδογενών αναστολέων των κασπασών, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μπορεί να αποτύχει στην πρόκληση κασπασο-εξαρτώμενης απόπτωσης και εξαιτίας της απώλειας ηλεκτρονίων τα κύτταρα μπορεί να οδηγηθούν σε νέκρωση.

Από τα μιτοχόνδρια απελευθερώνονται και άλλοι διαμεσολαβητές της απόπτωσης, όπως η προκασπάση-3.⁸⁵ Άλλη πρωτεΐνη ενεργοποίησης των κασπασών είναι και ο παράγοντας AIF (apoptosis inducing factor), ο οποίος φαίνεται ότι ενεργοποιεί *in vitro* την προκασπάση-3.^{86,87} Η δραστηριότητά του αναστέλλεται από τον zVAD-fmk (benzyloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone), ένα συνθετικό γενικό αναστολέα των κασπασών, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα ο AIF να είναι άλλη μια κασπάση.

4.5.3. Ενεργείς ρίζες οξυγόνου και κυτταρικό δυναμικό οξειδοαναγωγής. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης της οφειλόμενης σε πολλαπλά ερεθίσματα, προκαλείται αύξηση του υπεροξειδίου και υπεροξειδωση των λιπιδίων.⁸⁸ Όμως, η δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) μπορεί να είναι ένα σχετικά όψιμο γεγονός και να εμφανίζεται όταν τα κύτταρα έχουν πλέον εισέλθει στη διαδικασία ενεργοποίησης των κασπασών.

Οι προσπάθειες μελέτης της απόπτωσης σε συνθήκες ανοξίας έδειξαν ότι, μερικά τουλάχιστον, προαποπτωτικά ερεθίσματα λειτουργούν σε απουσία οξυγόνου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ύπαρξη ROS δεν αποτελεί προϋπόθεση για την απόπτωση.^{89,90} Το γεγονός, όμως, ότι μπορούν να δημιουργηθούν ROS σε αναερόβιες συνθήκες δεν επιτρέπει τον αποκλεισμό του ρόλου τους στην απόπτωση με βάση μόνο τα παραπάνω.⁹¹

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της διαδικασίας της απόπτωσης στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Η απώλεια των μιτοχονδρίων, όμως, δεν μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα από τον αποπτωτικό θάνατο, γιατί αυτά τα οργανίδια είναι απαραίτητα για τον επαρκή ενεργειακό μεταβολισμό, την παραγωγή λιπιδίων της μεμβράνης και την κυτταρική αύξηση.

Ακόμα κι αν υπάρχουν ελλείμματα στην αποπτωτική οδό εκτός από τα μιτοχόνδρια (όπως π.χ. στις κασπάσες), είναι πιθανό να μην εξασφαλιστεί η επιβίωση και η ανάπτυξη των κυττάρων, εξαιτίας του ρόλου των μιτοχονδρίων στην απόπτωση. Επομένως, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις κασπάσες είναι πιθανό να μην προάγουν την ογκογένεση.

Τα δεδομένα, λοιπόν, που προαναφέρθηκαν, αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων τόσο στη ζωή των κυττάρων, όσο και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

4.6. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2

Στα θηλαστικά, τα ανάλογα του ενζύμου CED-9 του *C. elegans* ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2.

Σε αντίθεση με το CED-9, που έχει αποκλειστικά αντιαποπτωτική δράση, τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να έχουν τόσο προαποπτωτική όσο και αντιαποπτωτική δράση.⁹² Τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας (όπως οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL) παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των κασπασών και κατ'επέκταση την απόπτωση. Όμως, οι πρωτεΐνες αυτές δεν δρουν μόνο με άμεση σύνδεση και απενεργοποίηση του παράγοντα APAF-1, αλλά και με σταθεροποίηση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και παρεμπόδιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.

Η πρωτεΐνη Bcl-2 αρχικά ανακαλύφθηκε στα λεμφώματα Β-κυτταρικής σειράς, ως πρωτο-ογκογονίδιο και χαρακτηρίζεται από τη χρωμοσωμική αναδιάταξη t(14;18). Προκαλεί ογκογένεση με την καταστολή της απόπτωσης κυρίως, παρά με την πρόκληση ταχείας κυτταρικής διαίρεσης.

Η υπερέκφραση των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση, που πυροδοτείται από μια σειρά ερεθισμάτων, όπως η ελάτπωση των παραγόντων ανάπτυξης, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ή με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και η έλλειψη του παράγοντα NGF σε νευρώνες. Σε κάποιες μόνο κυτταρικές σειρές η πρωτεΐνη Bcl-2 φάνηκε να προστατεύει το κύτταρο από την απόπτωση που επάγεται μέσω των υποδοχέων TNFR ή Fas.

Τα γονίδια της οικογένειας Bcl-2 είτε αναστέλλουν την απόπτωση (όπως τα *bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-w*, *mcl-1*, *nr13* και *A1/Bfl-1*), είτε την επάγουν (όπως τα *bax*, *bak*, *bok*, *dina*, *bcl-xS*, *bik*, *bim*, *hrk*, *nip3*, *nix*, *bad* και *bid*).⁹² Μεταξύ των μελών της οικογένειας Bcl-2 υπάρχει ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων και παρουσιάζουν μέχρι και τέσσερις περιοχές που διατηρούνται σταθερές και ονομάζονται BH: οι περιοχές BH1, BH2, BH3 και BH4. Στα προαποπτωτικά μέλη γίνεται φανερό ότι η BH3 περιοχή είναι απαραίτητη τόσο για το σχηματισμό διμερών με άλλα μέλη, όσο και για την επαγωγή της απόπτωσης.⁹³

4.6.1. Προαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τα ερευνητικά δεδομένα, τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 προκαλούν έναρξη της απόπτωσης μέσω του σχηματισμού πόρων στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα.

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας διαθέτουν καρβοξυτελικές υδροφοβικές μεμβρανο-προσφύμενες περιοχές, που τους επιτρέπουν να εγκαθίστανται στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Τα μέλη, όπως οι πρωτεΐνες Bad και Bid, στα οποία λείπουν τέτοιες περιοχές, είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, μπορούν

όμως να «μεταναστεύουν» στα μιτοχόνδρια, καθώς έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή με άλλα μέλη της οικογένειας. Αυτές οι ετεροδιμερείς συνδέσεις και μετατοπίσεις ρυθμίζονται από τη φωσφορυλίωση και την πρωτεόλυση. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση αναστέλλει τη σύνδεση της πρωτεΐνης Bad με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, ενώ η διασπασμένη μέσω κασπάσης-8 πρωτεΐνη Bid αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Bax στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα περισσότερα μελετημένα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας είναι οι πρωτεΐνες Bax και Bid.

Η πρωτεΐνη Bax, η οποία είναι φυσιολογικά μια κυταροπλασματική πρωτεΐνη, μετατοπίζεται προς τα μιτοχόνδρια ύστερα από έκθεση σε διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα ή stress.⁹⁴ Διαπιστώθηκε ότι αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, σχηματίζοντας πόρους και απελευθερώνοντας με αυτόν τον τρόπο κυτόχρωμα c. Δεν απαιτείται ενεργοποίηση των κασπασών ούτε για τη μετακίνηση της πρωτεΐνης ούτε για το σχηματισμό πόρων.

Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Bax, η πρωτεΐνη Bid απαιτεί πρωτεόλυση μέσω της κασπάσης-8 για την προαποπτωτική της λειτουργία. Μετά τη διάσπασή της, η πρωτεΐνη Bid «μεταναστεύει» από το κυταροπλασμα στα μιτοχόνδρια και απελευθερώνει κυτόχρωμα c, αυξάνοντας εκλεκτικά τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, πιθανόν λόγω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Bax.⁹⁵ Φαίνεται ότι μέσω της διάσπασης της Bid ενισχύονται τα καθοδικά εκτελεστικά γεγονότα της απόπτωσης που επάγεται μέσω των υποδοχέων θανάτου. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL δεν αναστέλλουν τη διάσπαση της Bid μέσω της κασπάσης-8 ούτε τη μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια, παρεμποδίζουν όμως την απελευθέρωση κυτοχρώματος c μέσω Bid. Παρόλα αυτά, η απόπτωση εξελίσσεται μέχρι τέλους, καθώς υπάρχουν και άλλα εκτελεστικά βήματα που τίθενται σε λειτουργία μέσω της κασπάσης-8.

4.6.2. Αντιαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες. Τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, που έχουν μελετηθεί πιο εκτεταμένα, είναι οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και λιγότερο στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στις πυρηνικές μεμβράνες. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν με το μόριο-προσαρμοστή APAF-1 (που παρουσιάζει ομολογία με τη CED-4 του *C. elegans*) και να παρεμποδίσουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (ομόλογο της CED-3).⁹⁶ Ο κύριος τρόπος δράσης των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL φαίνεται να είναι μιτοχονδριακός. Στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να δρουν παρεμποδίζοντας τη μιτο-

χονδριακή διαπερατότητα και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο απαιτείται για την ενεργοποίηση του παράγοντα APAF-1. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι μιτοχονδριακές δράσεις των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL εξαρτώνται από την ικανότητά τους να δημιουργούν διαύλους ιόντων, δεν υπάρχει όμως ένα ικανοποιητικό μοντέλο που να λαμβάνει υπόψη τις αντικρουόμενες δράσεις των πρωτεϊνών Bcl-2/Bcl-xL και Bax.⁹⁷

Αρχικά, διατυπώθηκε η άποψη ότι οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL ασκούν την προστατευτική τους δράση σχηματίζοντας ετεροδιμερή με προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bax, αναστέλλοντας μ' αυτόν τον τρόπο την αποσταθεροποίηση των μεμβρανών από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες.⁹⁸ Όμως, πειραματικά δεδομένα διαφόρων ερευνών θέτουν την άποψη αυτή υπό αμφισβήτηση. Για παράδειγμα, κατά το σχηματισμό ετεροδιμερούς μεταξύ της Bcl-xL και ενός προαποπτωτικού μέλους (Bax, Bak ή Bik) προκαλείται η απελευθέρωση του ετεροδιμερούς APAF-1-προκασπάσης από την Bcl-xL. Στη συνέχεια, ο παράγοντας APAF-1 οδηγεί την προκασπάση σε ενεργοποίηση μέσω αυτοδιάσπασης. Έτσι, η ενεργοποίηση των κασπασών μέσω αυτής της οδού εξαρτάται άμεσα από την κατάσταση διμερισμού των μελών της οικογένειας Bcl-2, ενώ αυτή, με τη σειρά της, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των προαποπτωτικών μελών (εικ. 2).

5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Πολλά ερωτηματικά παραμένουν ακόμα αναπάντητα για την αποπτωτική διαδικασία, τόσο στο επίπεδο των μοριακών συστατικών της, όσο και στο επίπεδο της *in vivo* ρύθμισης αυτής της διαδικασίας. Όπως και σε άλλα πεδία της έρευνας, νέα ερωτήματα εμφανίζονται με τον ίδιο ταχύ ρυθμό με τον οποίο βρίσκονται απαντήσεις για τα παλαιότερα.

Φτιάχνοντας το puzzle της απόπτωσης, όχι μόνο θα κατανοήσουμε βασικές βιολογικές διαδικασίες, αλλά θα υπάρχουν και ευρύτερες θεραπευτικές εφαρμογές. Θα χρησιμοποιηθεί πιθανότατα ο αποπτωτικός μηχανισμός για την εξάλειψη κυτάρων σε περιοχές με ανεπαρκή κυτταρικό θάνατο, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο. Από την άλλη μεριά, παράγοντες που δρουν ως αναστολείς της απόπτωσης, είναι πιθανό να μας προσφέρουν αξιόλογες θεραπευτικές δυνατότητες σε καταστάσεις με εκτεταμένη απόπτωση, όπως η HIV-λοίμωξη ή οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Η διευκρίνιση, επομένως, του αποπτωτικού μηχανισμού και η εξέταση των συστατικών του ένα προς ένα είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα, αλλά και μια πρόκληση, που αναμένεται να παρουσιάσει πολλές εκπλήξεις τα επόμενα χρόνια.

ABSTRACT

Apoptosis: Cell death necessary for lifeM. ANDRIKOULA,¹ G. VARTHOLOMATOS²

¹*Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Ioannina, Medical School,* ²*Laboratory of Hematology, Unit of Molecular Biology, University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece*
Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(5):496–513

Apoptosis is the form of cell death observed when death is a desirable or programmed event. It is the first characterization of an actively regulated mechanism of cell death in mammalian cells, with structural features different from those of necrosis. Apoptosis or programmed cell death is a stereotypic program of cell suicide which multicellular organisms use for the deletion of redundant, damaged or infected cells. Gene products which control programmed cell death have been identified and studied most completely in the nematode *C. elegans*. The control of apoptosis has gained the interest of a great number of scientists, as its vital role in physiological development, in tissue homeostasis and in defense against pathogens was recognised. It became understood that the imbalance between cell proliferation and programmed cell death can lead to cancer and to autoimmune and degenerative diseases. The apoptotic mechanism is rather complicated and the process remains unclear. This review summarizes data from research on signalling pathways through death receptors to proteolytic enzymes, result in DNA fragmentation and cell lysis. The understanding of the molecular components and cellular features of the apoptotic machinery will enable the development and application of more effective therapeutic strategies in which either the induction or the inhibition of programmed cell death will be of critical importance.

Key words: Apoptosis, Caspases, Death receptors, Necrosis

Βιβλιογραφία

1. GLUCKSMANN A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951, 26:59–86
2. KERR JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965, 90:419–435
3. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239–257
4. AMEISEN JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996, 272:1278–1279
5. THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267:1456–1462
6. HAANEN C, VERMES I. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol* 1996, 64:129–133
7. AMSTERDAM A, DANTES A, SELVARAJ N, AHARONI D. Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids* 1997, 62:207–211
8. ATWOOD CS, IKEDA M, VONDERHAAR BK. Involution of mouse mammary glands in whole organ culture: a model for studying programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 207:860–867
9. PAPPASOTIROPOULOS A, LUDWIG M, NAIB-MAJANI W, ROO GS. Induction of apoptosis and secondary necrosis in rat dorsal root ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein. *Neurosci Lett* 1996, 209:33–36
10. SAIKUMAR P, DONG Z, WEINBERG IM, VENKATACHALAM MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998, 17:3341–3349
11. RUBIN LL. Neuronal cell death: when, why, and how. *Br Med Bull* 1997, 53:617–631
12. GENG YJ. Regulations of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis. *Heart Vessels* 1997, 12(Suppl):76–80
13. MILAS L, STEPHENS LC, MEYN RE. Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo* 1994, 8:665–673
14. SEN S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society* 1992, 67:287–319
15. KIESS W, GALLAHER B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocr* 1998, 138:482–491
16. STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995, 267:1445–1449
17. HERMEKING H, EICK D. Mediation of c-Myc induced apoptosis by p53. *Science* 1994, 265:2091–2093
18. HARRINGTON EA, BENNETT MR, FANIDI A, EVAN GE. c-Myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 1994, 13:3286–3295
19. SHEIKH MS, ROCHEFORT H, GARCIA M. Overexpression of p21 WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 1995, 11:1899–1905

20. NAGATA S. Fas ligand and immune evasion. *Nat Med* 1996, 2: 1306–1307
21. CRISPE IN. Fatal interactions: fas-induced apoptosis of mature T cells. *Immunity* 1994, 1:347–349
22. WINQVIST O, SODERBERGH A, KAMPE O. The autoimmune basis of adrenocortical destruction in Addison's disease. *Mol Med Today* 1996, 2:282–289
23. CHERVONSKY AV, WANG Y, WONG FS, VISINTIN I, FLAVELL RA, JANEWAY CA JR ET AL. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997, 89:17–24
24. MITSIADES N, POULAKI V, KOTOULA V, MASTORAKOS G, TSELENI-BALFOUTA S, KOUTRAS DA ET AL. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:2199–2203
25. STROBEL T, SWANSON L, KORSMEYER S, CANNISTRA SA. Bax enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14094–14099
26. PRONK GL, RAMER K, AMIRI P, WILLIAMS LT. Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* 1996, 271:808–810
27. BOUDREAU N, SYMPSON CJ, WERB Z, BISSEL MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995, 267:891–893
28. LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GC, EARNSHAW WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *J Biol Chem* 1994, 371:346–347
29. TANAKA Y, YOSHIHARA K, ITAYA A, KAMIYA T, KOIDE SS. Mechanism of the inhibition of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1984, 259:6579–6585
30. KUMAR S. The bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CED-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis? *Cell Death Differ* 1997, 4:2–3
31. PARRIZAS M, LEROITH D. IGF-I inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the *bcl-xL* gene product. *Endocrinology* 1997, 138:1355–1358
32. OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993, 74:609–619
33. JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997, 88:347–354
34. MARSTERS SA, PITTI RM, SHERIDAN JP, ASHKENAZI A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Rec Prog Horm Res* 1999, 54: 225–234
35. NAGATA S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, 88:355–365
36. TARTAGLIA LA, AYRES TM, WONG GH, GOEDDEL DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993, 74: 845–853
37. ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998, 281:1305–1308
38. FRENCH LE, TSCHOPP J. Constitutive fas ligand expression in several non-lymphoid mouse tissue: implications for immune-protection and cell turnover. *Behring Inst Mitt* 1996, 97:156–160
39. HAHNE M, RIMOLDI D, SCHROTER M, ROMERO P, SCHREIER M, FRENCH LE ET AL. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: Implications for tumor immune escape. *Science* 1996, 274: 1363–1366
40. THORNE M, SCHNEIDER P, HOFMANN K, FICKENSCHER H, MEINL E, NEIPEL F ET AL. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997, 386:517–521
41. ZHANG J, CADO D, CHEN A, KABRA NH, WINOTO A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort 1. *Nature* 1998, 392:296–300
42. TARTAGLIA LA, GOEDDEL DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992, 13:151–153
43. BEG AA, BALTIMORE D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996, 274:782–784
44. SMITH CA, FARRAH T, GOODWIN RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins. *Cell* 1994, 76:959–962
45. ROTHE M, PAN MG, HENZEL WJ, AYRES TM, GOEDDEL DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995, 83:1243–1252
46. HSU H, HUANG J, SHU HB, BAICHWAL V, GOEDDEL DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF-receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996, 4:387–396
47. SHU HB, TAKEUCHI M, GOEDDEL DV. The tumor necrosis factor receptor-2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor-1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:13973–13978
48. DUAN H, DIXIT VM. RAIDD is a new "death" adaptor molecule. *Nature* 1997, 385:86–89
49. MARSTERS SA, SHERIDAN JP, PITTI RM, BRUSH J, GODDARD A, ASHKENAZI A. Identification of a ligand for the death-domain containing receptor Apo3. *Curr Biol* 1998, 8:525–528
50. WILEY SR, SCHOOLEY K, SMOLAK PJ, DIN WS, HUANG CP, NICHOLL JK ET AL. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995, 3:673–682
51. MARSTERS SA, PITTI RM, DONAHUE CJ, RUPPERT S, BAUER KD, ASHKENAZI A. Activation of apoptosis by Apo2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr Biol* 1996, 6:750–752
52. GOLSTEIN P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 1997, 7:R750–R753
53. MARSTERS SA, SHERIDAN JP, PITTI RM, HUANG A, SKUBATCH M, BALDWIN D. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997, 7:1003–1006
54. SAIKUMAR P, DONG Z, MIKHAILOV V, DENTON M, WEINBERG JM, VENKATACHALAM MA. Apoptosis: Definition, mechanisms and relevance to disease. *Am J Med* 1999, 107:489–506
55. WILSON KP, BLACK JA, THOMSON JA, KIM EE, GRIFFITH JP, NAVIA MA ET AL. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 1994, 370:270–275
56. ROTONDA J, NICHOLSON DW, FAZIL KM, GALLANT M, GAREAU Y, LABELLA ET AL. The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key model of apoptosis. *Nat Struct Biol* 1996, 3:619–625
57. THORNBERRY NA, RANO TA, PETERSON EP, RASPER DM, TIMKEY T, CARCIA-CALVO M ET AL. A combinatorial approach defines specificities of members of caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997, 272:17907–17911
58. PORTER AG, JANICKE RU. Death substrates come alive. *Bioessays* 1997, 19:501–507
59. CRVNS V, YUAN J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998, 12:1551–1570
60. ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391:43–50
61. LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997, 89:175–184

62. TAKAHASHI A, ALNEMRI ES, LAZEBNIK YA, FERNANDES-ALNEMRI T, LITWACK G, MOIR RD ET AL. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin-1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:8395-8400
63. ORTH K, CHINNAIYAN AM, GARG M, FROELICH CJ, DIXIT VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 1996, 271:16443-16446
64. RHEAUME E, COHEN LY, UHLMANN F, LAZURE C, ALAM A, HURWITZ J ET AL. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 *in vitro* and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J* 1997, 16:6346-6354
65. HAKEM R, HAKEM A, DUNCAN GS, HENDERSON JT, WOO M, SOENGAS MS ET AL. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell* 1998, 94:339-352
66. MUZIO M, CHINNAIYAN AM, KISCHKEL FC, O'ROURKE K, SHEVCHENKO A, NI J ET AL. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996, 85:817-827
67. LI P, NIJHAWAN D, BUDIARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES ET AL. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91:479-489
68. MEDEMA JP, SCAFFIDI C, KISCHKEL FC, SHERCHENKO A, MANN M, KRAMER PH ET AL. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997, 16:2794-2804
69. RAY CA, BLACK RA, KRONHEIM SR, GREENSTREET TA, SLEATH PR, SALVESEN GS ET AL. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1992, 69:597-604
70. BUMP NJ, HACKETT M, HUGUNIN M, SESHAGIRI S, BRADY K, CHEN P ET AL. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995, 269:1885-1888
71. XUE D, HORVITZ HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 1995, 377:248-251
72. UREN AG, COULSON EJ, VAUX DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* 1998, 23:159-162
73. AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997, 3:917-921
74. SOMERVILLE MJ, HUNTER AG, AUBRY HL, KORNELUK RG, MACKENZIE AE, SURH LC. Clinical application of the molecular diagnosis of spinal muscular atrophy: deletions of neuronal apoptosis inhibitor protein and survival motor neuron genes. *Am J Med Genet* 1997, 69:159-165
75. XU DG, CROCKER SJ, DOUCET JP, ST-JEAN M, TAMAI K, HAKIM AM ET AL. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 1997, 3:997-1004
76. SIMONS M, BEINROTH S, GLEICHMANN M, LISTON P, KORNLUK RG, MACKENZIE AE ET AL. Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 1999, 72:292-301
77. JACOBSON MD, BURNC JR, KING MP, MIYASHITA T, REED JC, RAFF MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993, 361:365-369
78. XIANG J, CHAO DT, KORSMEYER SJ. Bax-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14559-14563
79. SCAIFE JF. The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Can J Biochem* 1966, 44:433-448
80. 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 J* 1998, 17:37-49
81. EGUCHI Y, SHIMIZU S, TSUJIMOTO Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997, 57:1835-1840
82. NEWMAYER D, FARSCHEON DM, REED JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2. *Cell* 1994, 79:353-364
83. LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP. *Cell* 1996, 86:147-157
84. VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, WILLIAMSON EK, SCHUMACKER PT, THOMPSON CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997, 91:627-637
85. MANCINI M, NICHOLSON DW, ROY S, THORNBERRY NA, PETERSON EP, CASCIOLA-ROSEN LA ET AL. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998, 140:1485-1495
86. SUSIN SA, ZAMZAMI N, CASTEDO M, HIRSCH T, MARCHETTI P, MACHO A ET AL. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996, 184:1331-1341
87. SUSIN SA, ZAMZAMI N, CASTEDO M, DAUGAS E, WANG HG, GELEY S ET AL. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997, 186:25-37
88. BREDESEN DE. Neural apoptosis. *Ann Neurol* 1995, 38:839-851
89. JACOBSON MD, RAFF MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 1995, 374:814-816
90. SHIMIZU S, EGUCHI Y, KOSAKA H, KAMIIE W, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-XL. *Nature* 1995, 374:811-813
91. DEGLI ESPOSTI M, McLENNAN H. Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobic relevance to ceramide-induced apoptosis. *FEBS Lett* 1998, 430:338-342
92. REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998, 17:3225-3236
93. KELEKAR A, THOMPSON CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998, 8:324-330
94. HSU YT, WOLTER KG, YOULE RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:3668-3672
95. DESAGHER S, OSEN-SAND A, NICHOLS A, ESKEES R, MONTESSUIT S, LAUPER S ET AL. Bid-induced conformational change of bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999, 144:891-901
96. HU Y, BENEDICT MA, WU D, INOHARA N, NUNEZ G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:4386-4391
97. SCHENDEL SL, MONTAL M, REED JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 1998, 5:372-380
98. OTTER I, CONUS S, RAVN U, RAGER M, OLIVIER R, MONNEY L ET AL. The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 1998, 273:6110-6120

Corresponding author:

G. Vartholomatos, Laboratory of Hematology, Unit of Molecular Biology, University Hospital of Ioannina, Dourouti, GR-455 00 Ioannina, Greece