



Απόπτωση – Εξωκερικό μονοπάτι

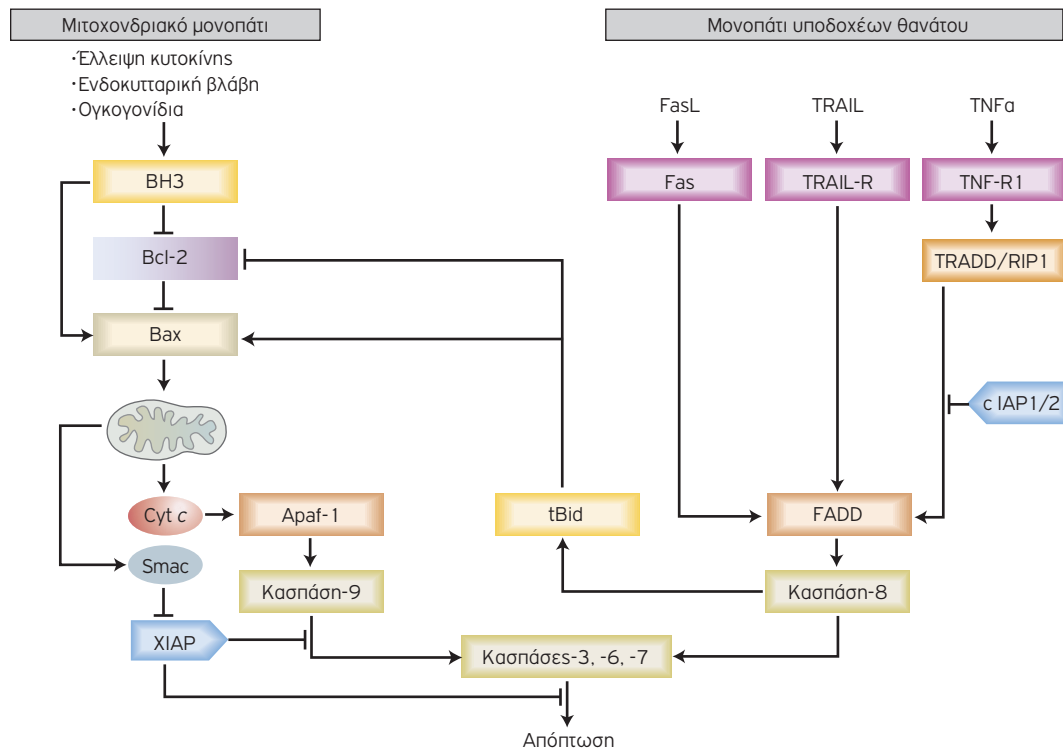
Τα κύτταρα λαμβάνουν και επεξεργάζονται διάφορα εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα. Ο δυναμικός χαρακτήρας των κυττάρων τους επιτρέπει να αντιλαμβάνονται και να αποκρίνονται άμεσα στα ερεθίσματα αυτά, διεργασίες που είναι ουσιώδεις για την κυτταρική επιβίωση. Τα πολλαπλά σήματα θανάτου και επιβίωσης ενοποιούνται και δημιουργούν τον αποπτωτικό μηχανισμό με τη βοήθεια δικτύων μεταγωγής σήματος, τα οποία ρυθμίζονται από αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, την υποκυτταρική θέση των πρωτεϊνών και κύριες πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, όπως π.χ., η φωσφορυλίωση, η προσθήκη μορίων Ub και η θραύση. Η ισορροπία ανάμεσα στα προ και τα αντι-αποπτωτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος καθορίζει την τύχη των κυττάρων που αποκρίνονται σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα, αφού μεγαλύτερη ή μικρότερη έκταση του κυτταρικού θανάτου μπορεί να προκαλέσει παθολογικές καταστάσεις, περιλαμβανομένων των αναπτυξιακών ανωμαλιών, των αυτοάνοσων νοσημάτων, του νευροεκφυλισμού ή του καρκίνου.

Τα προγράμματα του κυτταρικού θανάτου εξελίχθηκαν για να αντιμετωπίσουν πολλές ανάγκες. Ενώ ορισμένοι μονοκύτταροι οργανισμοί επιζητούν τον κυτταρικό θάνατο για να εναρμονιστεί ο αριθμός των κυττάρων με το απόθεμα τροφής, οι πολυκύτταροι οργανισμοί χρησιμοποιούν την «αλτρουιστική» κυτταρική αυτοκτονία για διάφορους ουσιώδεις λόγους, όπως την εμβρυογένεση, την ανάπτυξη των νευρώνων, τη διατήρηση της ομοιόστασης σε ταχέως ανανεωνόμενους ιστούς των ενθλίκων ατόμων, την καταστροφή ελαττωματικών ή δυνητικά επικίνδυνων κυττάρων και τέλος τον περιορισμό της επέκτασης της μόλυνσης που προκαλείται από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Τα μονοπάτια μεταγωγής του αποπτωτικού σήματος στα φυσιολογικά κύτταρα είναι ανενεργά και ενεργοποιούνται μόνο από κάποιο σήμα θανάτου. Πρέπει να τονι-

στεί ότι όλο το δίκτυο του μηχανισμού της απόπτωσης είναι γενετικά κωδικοποιημένο και έτοιμο για δράση σε όλους σχεδόν του κυτταρικούς τύπους. Συνεπώς η ρεαλιστική άποψη για τον κυτταρικό θάνατο είναι ότι όλα τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών είναι προγραμματισμένα να αυτοκαταστραφούν και θα πεθάνουν εκτός και αν οι μηχανισμοί του κυτταρικού θανάτου βρίσκονται συνεχώς σε καταστολή από σήματα επιβίωσης, όπως π.χ., αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, θρεπτικά συστατικά κ.ά., που παρέχονται από άλλα κύτταρα ή από το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Συνεπώς η επιβίωση πολλών κυττάρων θηλαστικών εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα αναπτυξιακών παραγόντων που παρεμποδίζουν τα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι η πρόληψη της απόπτωσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από τους παράγοντες διέγερσης αποικίας CSFs. Η απόπτωση ουσιαστικά υφίσταται «κοινωνικό έλεγχο» και δεν είναι «απόφαση» ενός μόνο κυττάρου. Αυτά τα σήματα επιβίωσης αυξάνουν την έκφραση ή/και τη δραστηριότητα των αντι-αποπτωτικών ρυθμιστικών μορίων διατηρώντας υπό συνεχή έλεγχο τη δραστηριότητα των προ-αποπτωτικών παραγόντων.

Το πρόγραμμα της απόπτωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί, κυρίως, από δύο διαφορετικά, εξελικτικά συντηρημένα, μονοπάτια: το **εξωκερικό** και το **εσωκερικό μονοπάτι της απόπτωσης**. Υπάρχει και ένα τρίτο μονοπάτι, το **μονοπάτι granzyme B**, στο οποίο η κυτταροτοξική πρωτεάση granzyme B μεταφέρεται στα κύτταρα-στόχους μετά την απελευθέρωσή της από κυτταροτοξικά κύτταρα. Και τα τρία μονοπάτια συγκλίνουν τελικά στην ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών, οι οποίες είναι ουσιώδεις για την εκτέλεση της απόπτωσης αφού προκαλούν τη θραύση πολλών πρωτεϊνών και συμβάλλουν στη δομική αποσυγκρότηση του κυττάρου. Η φάση της εκτέλεσης/αποικοδόμησης είναι κοινή στους διάφορους



Εικόνα 3.1. Τα δύο κύρια μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών στα σπονδυλωτά. Το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου (εξωτερικό μονοπάτι) ξεκινά με την ενεργοποίηση των υποδοχέων της οικογένειας TNF της κυτταρικής επιφάνειας, ενώ το μιτοχονδριακό μονοπάτι (εσωτερικό μονοπάτι) ρυθμίζεται από μέλη της οικογένειας Bcl-2. Το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου οδηγεί, μέσω της συμμετοχής της πρωτεΐνης προσαρμογής FADD (και με τη βοήθεια της TRADD για ορισμένους υποδοχείς θανάτου), στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 η οποία κατόπιν ενεργοποιεί τις κασπάσες-3, -6 και -7. Η κασπάση-8 προκαλεί επίσης τη θραύση της BH3-only πρωτεΐνης Bid, και το θραύσμα tBid μπορεί στη συνέχεια να ενεργοποιήσει το μιτοχονδριακό μονοπάτι. Μέσω της MOMP απελευθερώνεται το Cyt c που συμβάλλει μαζί με την Apaf-1 στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η κυτταροπλασματική XIAP μπορεί να παρεμποδίσει τη δράση των κασπασών-3 και -7 (καθώς επίσης και της κασπάσης-9), αλλά η παρεμπόδιση αυτή αίρεται από τη δράση της πρωτεΐνης Smac/DIABLO η οποία απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια. Οι E3 λιγάσες της Ub cIAP1 και cIAP2 δρουν παρεμποδίζοντας το σχηματισμό του συμπλόκου DISC (που ενεργοποιεί την κασπάση-8) για το σήμα θανάτου που ξεκινά από τον υποδοχέα TNF-R1, ενώ μπορεί να ρυθμίσει και τα μονοπάτια επιβίωσης με τη συμμετοχή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Από Strasser και συν., 2011.

Πίνακας 3.1. ΚΥΡΙΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ – ΕΝΑΡΞΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ

Έναρξη απόπτωσης	Φυσιολογικά αποτελέσματα
Απόπτωση μέσω Fas-FasL (Εξωτερικό μονοπάτι)	Η απόπτωση αρχίζει με τη σύνδεση του FasL, που παράγεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον υποδοχέα Fas. Ο FasL συνδέεται στον υποδοχέα Fas των T κυττάρων και ενεργοποιείται το πρόγραμμα του κυτταρικού θανάτου. Η διεργασία αυτή είναι σημαντική διότι απομακρύνει τα λεμφοκύτταρα από το ανοσοποιητικό σύστημα.
Απόπτωση μέσω του TNF – TNF-R1 (Εξωτερικό μονοπάτι)	Όταν η κυτοκίνη TNFα συνδεθεί στον υποδοχέα TNF-R1, ενεργοποιείται η απόπτωση με την προσέλευση της πρωτεΐνης προσαρμογής TRADD, στην οποία συνδέεται η FADD, με συνέπεια την ενεργοποίηση των κασπασών.
Απόπτωση λόγω έλλειψης αυξητικών παραγόντων (Εσωτερικό μονοπάτι)	Η επιβίωση του κυττάρου εξαρτάται από τις κυτοκίνες ή τους αυξητικούς παράγοντες. Τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στην ΕΞΜΜ και συμβάλλουν στη διαπερατότητα της μεμβράνης αυτής. Έτσι, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα διάφοροι αποπτωγενείς παράγοντες ενεργοποιώντας τις κασπάσες για την ολοκλήρωση της απόπτωσης.
Απόπτωση λόγω βλάβης του DNA (Εσωτερικό μονοπάτι)	Ακτινοβολία ή χημειοθεραπευτικά μέσα διεγείρουν την απόπτωση λόγω βλάβης του DNA μέσω του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Το γονίδιο p53 κανονικά διεγείρει την απόπτωση, αλλά όταν μεταλλαχθεί ή απουσιάζει ευνοείται η κυτταρική επιβίωση.

τύπους της απόπτωσης, δηλ. οι μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές του τελευταίου σταδίου της απόπτωσης είναι ανεξάρτητες από το αρχικό σήμα θανάτου.

Στο **εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης** εξωκυτταρικοί ligands θανάτου, όπως οι FasL, TNFα και TRAIL (εκκρινόμενες πρωτεΐνες που συμπεριφέρονται ως κυτοκίνες ρυθμίζοντας τη φλεγμονή και άλλες διεργασίες που σχετίζονται με την ανοσία, ενώ εκφράζονται επίσης ως μεμβρανικές πρωτεΐνες στα λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα NK που τις χρησιμοποιούν για να σκοτώνουν μολυσμένα ή καρκινικά κύτταρα επάγοντας την απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα-στόχους), συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου της κυτταρικής επιφάνειας. Ακολουθεί η προσέλκυση και η ενεργοποίηση των κασπασών έναρξης (προ-κασπάση-8 και/ή -10) σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το **σύμπλοκο DISC**, και στη συνέχεια η θραύση και η ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών, όπως η κασπάση-3. Το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης έχει ιδιαίτερη σημασία για την ομοιοσταση του ανοσοποιητικού συστήματος και τη λειτουργία του. Το **εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης** χαρακτηρίζεται από τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cyt c) και άλλων αποπτωγενών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Το Cyt c αποτελεί συν-παράγοντα για τον ολιγομερισμό της Araf-1 και την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-9. Το σύμπλοκο ενεργοποίησης των κασπασών έναρξης του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης είναι γνωστό ως **αποπτώσωμα** και η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών. Ενώ το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης είναι ζωτικής σημασίας για την ομοιοσταση του ιστού και τις αποκρίσεις στα κυτταρικά πλήγματα, το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση και στην ογκογένεση (Πίν. 3.1).

Αρχικά πιστευόταν ότι το εξωτερικό και το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Τώρα όμως είναι γνωστό ότι υπάρχει μια ενδοεπικοινωνία μεταξύ τους, η οποία επιτυγχάνεται από τη BH3-only πρωτεΐνη Bid. Μετά την ενεργοποίηση του εξωτερικού μονοπατιού σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, η κασπάση-8 προκαλεί τη θραύση της Bid. Η σχηματιζόμενη tBid διευκολύνει την ενεργοποίηση της Bax, τον ολιγομερισμό της και την είσοδό της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (ΕΞΜΜ). Η tBid που δημιουργήθηκε από την ενεργοποίηση του εξωτερικού μονοπατιού, ενεργοποιεί το εσωτερικό μονοπάτι για να εξασφαλιστεί η πλήρης εκτέλεση της απόπτωσης, ενισχύοντας έτσι το αρχικό σήμα θανάτου (Εικ. 3.1).

3.1. ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Το **εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης** ή μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου ξεκινά με τη διέγερση των μελών της υποοικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων, κυρίως των TNF-R1, Fas/CD95 ή TRAIL-Rs, που ονομάζονται **υποδοχείς θανάτου** και βρίσκονται στη κυτταρική επιφάνεια, από τους αντίστοιχους **ligands θανάτου** TNFα, FasL ή TRAIL. Οι υποδοχείς θανάτου βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια ως προ-συγκροτημένα ολιγομερή.

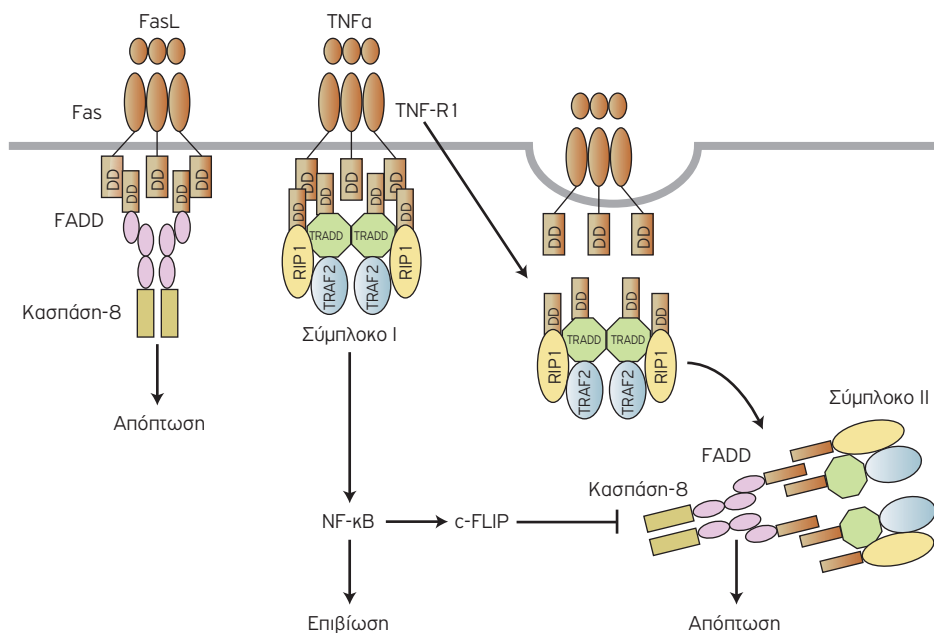
Οι υποδοχείς θανάτου έχουν διαφορετική ακολουθία αμινοξέων που καθορίζει την εξειδίκευση του ligand που συνδέεται μαζί τους και χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τις πρωτεΐνες προσαρμογής που ενώνονται στο κυτταροπλασματικό τμήμα των υποδοχέων. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους υποδοχείς Fas, DR4/TRAIL-R1 και DR5/TRAIL-R2 στους οποίους η πρωτεΐνη προσαρμογής FADD συνδέεται άμεσα και με την προσέλκυση της προ-κασπάσης-8 δημιουργείται το σύμπλοκο DISC. Οι υποδοχείς Fas και DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2 ενεργοποιούνται με την πρόσδεση των FasL και TRAIL, αντίστοιχα και συνδέονται ομοτυπικά με την περιοχή DD της FADD. Στη συνέχεια προσελκύεται στη FADD, μέσω ομοτυπικής αλληλεπίδρασης των περιοχών DED, η κασπάση-8 και -10. Το σύμπλοκο DISC διευκολύνει την αυτο-πρωτεολυτική ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και -10 και την επακολουθούσα απόπτωση.

Η δεύτερη ομάδα των υποδοχέων θανάτου περιλαμβάνει τους υποδοχείς TNF-R1, DR3, DR6 και EDAR οι οποίοι προσελκύουν την πρωτεΐνη προσαρμογής TRADD που ενώνει τους υποδοχείς θανάτου με τις TRAF2/5, RIP1 και cIAPs σχηματίζοντας έτσι ένα σύμπλοκο μεταγωγής σήματος που ονομάζεται **σύμπλοκο I**. Το σύμπλοκο I συγκροτείται κοντά στην πλασματική μεμβράνη και διεγείρει το μονοπάτι MAPK/JNK το οποίο συμμετέχει στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση. Το σύμπλοκο I διεγείρει επίσης το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, διευκολύνοντας έτσι την κυτταρική επιβίωση και το φλεγμονώδες σήμα. Η διέγερση του μονοπατιού NF-κΒ μέσω του συμπλόκου I προκαλείται λόγω της προσθήκης πολλών μορίων Ub που συνδέονται στη Lys⁶³ της κινάσης RIP1 από τις cIAPs και τη γραμμική προσθήκη μορίων Ub στην κινάση RIP1 από το σύμπλοκο LUBAC. Η διαδικασία αυτή προκαλεί, τελικώς, τη φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του παρεμποδιστικού συμπλόκου IκΒ που απομονώνει το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ στο κυτταρόπλασμα. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ που απελευθερώνεται εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, πρω-

τείνες επιβίωσης και φλεγμονώδεις παράγοντες. Η δεύτερη ομάδα των υποδοχέων θανάτου μπορεί επίσης να σχηματίσει το κυτταροπλασματικό **σύμπλοκο II**. Το ένζυμο αφαίρεσης μορίων Ub CYLD (και πιθανόν και άλλες DUBs) αφαιρεί τα μόρια Ub που είχαν συνδεθεί στην κινάση RIP1, με αποτέλεσμα την εσωτερίκευση του συμπλόκου. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση του συμπλόκου I μετά την εσωτερίκευση του υποδοχέα δημιουργούν δύο είδη κυτταροπλασματικών συμπλόκων II: το **σύμπλοκο IIa** που εξαρτάται από την TRADD και το **σύμπλοκο IIb** που εξαρτάται από την κινάση RIP1. Και τα δύο αυτά σύμπλοκα μπορεί να ξεκινήσουν την απόπτωση. Η TRADD προσελκύει τη FADD και την προ-κασπάση-8, σχηματίζοντας το σύμπλοκο IIa όπου ενεργοποιείται η κασπάση-8. Το σύμπλοκο IIb αποτελείται από τις RIP1, FADD και προ-κασπάση-8 και ρυθμίζεται αρνητικά από τις cIAPs, αφού η κινάση RIP1 στην οποίαν έχουν προστεθεί πολλά μόρια Ub δεν μπορεί να ενσωματωθεί στο σύμπλοκο IIb. Έτσι, οι ανταγωνιστές των IAPs που επάγουν την αποικοδόμηση των IAPs στα πρωτεασώματα προάγουν το σχηματισμό του συμπλόκου IIb και την επακολουθούσα απόπτωση μετά την ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Οι ισορροπίες ανάμεσα στα δύο μονοπάτια που οδηγούν

στο σχηματισμό των συμπλόκων I και II καθορίζουν την τελική τύχη του κυττάρου και βασίζονται στην πρωτεΐνη c-FLIP που είναι παρεμποδιστής της κασπάσης-8. Όταν η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB του συμπλόκου I είναι επαρκής, εκφράζεται αρκετή ποσότητα της c-FLIP με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δραστηριότητας της κασπάσης-8 του συμπλόκου II. Έτσι, το σύμπλοκο II θα προκαλέσει την έναρξη της απόπτωσης μόνο όταν η μέσω του συμπλόκου I ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB είναι ανεπαρκής ή όταν παρεμποδιστεί η μεταγωγή σήματος από το σύμπλοκο I (Εικ. 3.2).

Η εσωτερίκευση των υποδοχέων TNF-R1 και Fas είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για τη διαφοροποίηση της μεταγωγής σήματος που έχει διαφορετικά βιολογικά αποτελέσματα μετά τη σύνδεση των αντίστοιχων ligands θανάτου. Η εσωτερίκευση των υποδοχέων TNF-R1 και Fas που γίνεται με τη διαμεσολάβηση της καλθρίνης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την προσέλκυση των πρωτεϊνών που σχηματίζουν το σύμπλοκο DISC και τη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος από το ενδοσωμικό διαμέρισμα. Αντίθετα, η αντι-αποπτωτική μεταγωγή σήματος μέσω των NF-κB και MAPKs γίνεται ανεξάρτη-



Εικόνα 3.2. Απεικόνιση του μονοπατιού των υποδοχέων θανάτου (εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης). Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις Fas/FasL, TNF-R1/TNFα και TRAIL-R1/TRAIL. Η σύνδεση των ligands στους αντίστοιχους υποδοχείς ενεργοποιεί την καθοδική μεταγωγή σήματος και το σχηματισμό το συμπλόκου DISC. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κB (που συμβάλλει στην κυτταρική επιβίωση) ενισχύει τη μεταγραφική αντι-αποπτωτικών γονιδίων, όπως π.χ. του γονιδίου *c-FLIP*, και παρεμποδίζει την απόπτωση (σύμπλοκο I). Η αφαίρεση των μορίων Ub που είχαν προστεθεί στην κινάση RIP1 επιτρέπει την εσωτερίκευση του συμπλόκου και τη μετατροπή του σε σύμπλοκο II με την προσθήκη των FADD και προ-κασπάσης-8. Η μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων θανάτου σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και προάγει την απόπτωση είτε ενεργοποιώντας άμεσα τις κασπάσεις-εκτελεστές (π.χ., κασπάση-3), είτε έμμεσα μέσω της θραύσης της Bid, τη δημιουργία της tBid και την ενεργοποίηση του εσωτερικού (μιτοχονδριακού) μονοπατιού της απόπτωσης που ενισχύει το αποπτωτικό σήμα.

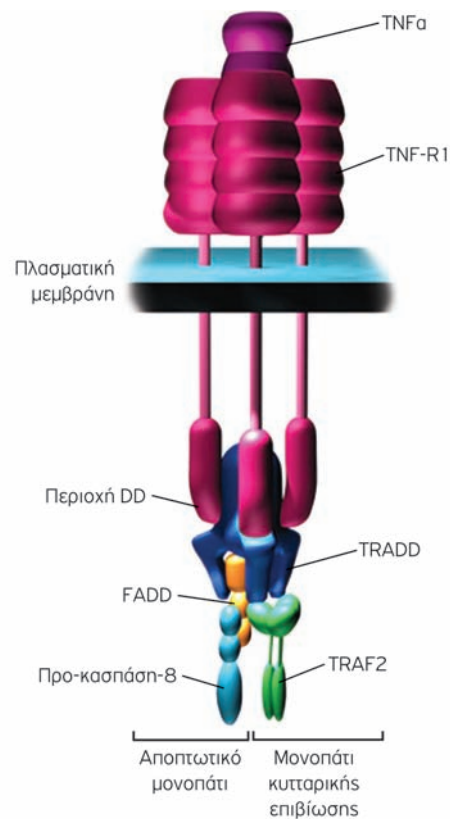
τα από την εσωτερίκευση των υποδοχέων, μέσω της σύνδεσης των RIP1 και TRAF2 στον υποδοχέα TNF-R1 ή της προσέλλυσης μικρής ποσότητας κασπάσης-8 στον υποδοχέα Fas, αντίστοιχα. Η φυσιολογική σημασία της εσωτερίκευσης του υποδοχέα TNF-R1 γίνεται προφανής όταν ληφθεί υπόψη η μόλυνση των κυττάρων από παθολόγους μικροοργανισμούς: οι αδενοϊοί, π.χ., χρησιμοποιούν την παρεμπόδιση της ενδοκύτωσης του υποδοχέα TNF-R1 για να παρεμποδίσουν εκλεκτικά την επαγόμενη από τον TNFα απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων, χωρίς να επηρεάζουν τα άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ξεκινούν από την κυτταρική επιφάνεια.

Επιγραμματικά, μπορεί να τονιστεί ότι στην περίπτωση των υποδοχέων Fas και TRAIL-R η πρωτεΐνη προσαρμογής FADD προσελλύεται άμεσα στον υποδοχέα, ενώ στη περίπτωση του υποδοχέα TNF-R1 συνδέεται πρώτα η πρωτεΐνη προσαρμογής TRADD και κατόπιν η FADD. Η σύνδεση των TRADD, FADD και κασπάσης-8 στο σύμπλοκο DISC, με συνέπεια την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού, εξαρτάται από την ενδοκύτωση του υποδοχέα TNF-R1. Το ίδιο πιστεύεται ότι συμβαίνει και στην περίπτωση του υποδοχέα Fas. Αντίθετα, για το σχηματισμό του συμπλόκου DISC δεν είναι απαραίτητη η ενδοκύτωση του υποδοχέα TRAIL-R.

Το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης είναι παρόμοιο στα θηλαστικά και τα ψάρια και φαίνεται ότι υπάρχει μόνο στα σπονδυλωτά. Στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* δεν έχουν βρεθεί υποδοχείς θανάτου. Στη *Drosophila*, η ομόλογη του TNFα πρωτεΐνη Wengen μπορεί να επάγει τον κυτταρικό θάνατο, αλλά αυτή η μορφή του κυτταρικού θανάτου δεν είναι η κλασική απόπτωση και δεν απαιτεί την κασπάση-8.

3.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΘΑΝΑΤΟΥ – LIGANDS ΘΑΝΑΤΟΥ

Υπάρχουν τρία κύρια ζεύγη υποδοχέων θανάτου – ligands θανάτου, τα μέλη των οποίων ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων TNF-Rs: 1) ο υποδοχέας Fas και ο FasL, 2) οι υποδοχείς TRAIL-R1 (DR4) και TRAIL-R2 (DR5) και ο TRAIL, και 3) ο υποδοχέας TNF-R1 και ο TNFα. Τα μέλη της οικογένειας των TNF ligands παράγονται αρχικά ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II και σχηματίζουν σταθερά ομοτριμερή. Όλοι οι υποδοχείς θανάτου είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I, οι οποίοι έχουν στο εξωκυτταρικό τμήμα τους δύο έως τέσσερις περιοχές πλούσιες σε Cys, μια διαμεμβρανική περιοχή και τη συντηρημένη ενδοκυτταρική περιοχή DD που αποτελείται από ~80 αμινοξέα. Η περιοχή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβίβαση του σήματος θανάτου από το εξωκυτταρικό περιβάλλον στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια



Εικόνα 3.3. Απεικόνιση της δομής του υποδοχέα TNF-R1. Η σύνδεση του TNFα στο εξωκυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα επιφέρει την ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών περιοχών DD στις οποίες συνδέεται αρχικά η πρωτεΐνη προσαρμογής TRADD και στη συνέχεια η πρωτεΐνη προσαρμογής FADD. Ανάλογα με τη θέση του συμπλόκου που σχηματίζεται (παράμοιη στην πλασματική μεμβράνη ή μετατόπιση στο κυτταρόπλασμα) και τις πρωτεΐνες που προσελλύονται, ο υποδοχέας TNF-R1 μπορεί να μεταβιβάσει σήματα για την κυτταρική επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο.

μεταγωγής σήματος. Η περιοχή DD του υποδοχέα θανάτου αλληλεπιδρά με την περιοχή DD των πρωτεϊνών προσαρμογής FADD και TRADD. Η FADD έχει μια ακόμη περιοχή, την περιοχή DED η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή DED των κασπασών-8 και -10, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία του συμπλόκου ενεργοποίησης DISC (Εικ. 3.3). Για τη μεταβίβαση του σήματος θανάτου ο υποδοχέας θανάτου πρέπει να σχηματίσει τριμερή. Αρχικά πιστευόταν ότι ο τριμερισμός των υποδοχέων θανάτου οφείλεται στη σύνδεση των αντίστοιχων ligands, αλλά μετέπειτα βρέθηκε ότι οι υποδοχείς θανάτου έχουν τριμεριστεί πριν από τη σύνδεση των ligands. Η σύνδεση των ligands στους υποδοχείς θανάτου ενεργοποιεί τους υποδοχείς θανάτου και οδηγεί στην προσέλλυση των πρωτεϊνών προσαρμογής FADD και TRADD στους υποδοχείς αυτούς μέσω αλληλεπιδράσεων των περιοχών DD.

Εκτός από τους τρεις κύριους υποδοχείς θανάτου TNF-R1, Fas και TRAIL-R υπάρχουν επίσης τέσσερις υ-

ποδοχείς-«δολώματα» (decoy receptors): ο DcR3 για τον υποδοχέα Fas και οι DcR1, DcR2 και η οστεοπρωτεγερίνη (OPG) για τον υποδοχέα TRAIL-R. Οι υποδοχείς-δολώματα DcR3 και OPG είναι διαλυτές εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, ενώ οι DcR1 και DcR2 είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Λόγω της έλλειψης λειτουργικής περιοχής θανάτου, οι υποδοχείς-«δολώματα» δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι της απόπτωσης. Όμως, ανταγωνιζόμενοι με τους υποδοχείς θανάτου για σύνδεση με τους αντίστοιχους ligands, οι υποδοχείς-«δολώματα» μπορεί να παρεμποδίσουν το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης.

3.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης ελέγχεται από αρκετούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Κρίσιμοι ρυθμιστές της μεταγωγής σήματος από τους υποδοχείς θανάτου είναι οι c-FLIPs. Όλες οι ισομορφές c-FLIP (περιλαμβανομένων των c-FLIP_L, c-FLIP_S και c-FLIP_R) έχουν δύο περιοχές DED και συνδέονται στη FADD μέσω αλληλεπιδράσεων των περιοχών DED. Όλες οι c-FLIPs προλαμβάνουν το σχηματισμό του συμπλόκου DISC και την απόπτωση ανταγωνιζόμενες με την προ-κασπάση-8 για σύνδεση στη FADD. Όμως, ο ρόλος της c-FLIP_L στην απόπτωση είναι ακόμη αμφιλεγόμενος. Η c-FLIP_L εκτός από τις δύο περιοχές DED, έχει ακόμη μια περιοχή που μοιάζει με την κασπάση-8 και μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερή με την κασπάση-8 προκαλώντας μερική αυτοεπεξεργασία της κασπάσης-8 με αποτέλεσμα τη δημιουργία των θραυσμάτων p43/41 και p12. Τα επίπεδα της c-FLIP ρυθμίζονται από πολλά μονοπάτια. Η κινάση JNK, π.χ., που ενεργοποιείται από τον TNFα μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει την E3 λιγάση της Ub Itch, με συνέπεια την προσθήκη πολλών μορίων Ub στη c-FLIP και την αποικοδόμησή της στα πρωτεασώματα. Επιπλέον, το μονοπάτι PI3-K/Akt μπορεί να ρυθμίσει ανοδικά την έκφραση της c-FLIP. Και οι δύο ισομορφές c-FLIP_S και c-FLIP_L μπορεί να προλάβουν την ενεργοποίηση των κασπασών, αν και πιστεύεται ότι η c-FLIP_L, όταν εκφράζεται σε μικρές συγκεντρώσεις, μπορεί να διευκολύνει τη σύνδεση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8.

Οι υποδοχείς θανάτου μπορεί να υποστούν αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η προσθήκη παλμιτικών ομάδων στον υποδοχέα Fas, π.χ., διευκολύνει το σχηματισμό συμπλόκων DISC με μεγάλο MB τα οποία περιέχουν τη FADD και την προ-κασπάση-8, με συνέπεια την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η Ο-γλυκοσυλίωση των υποδο-

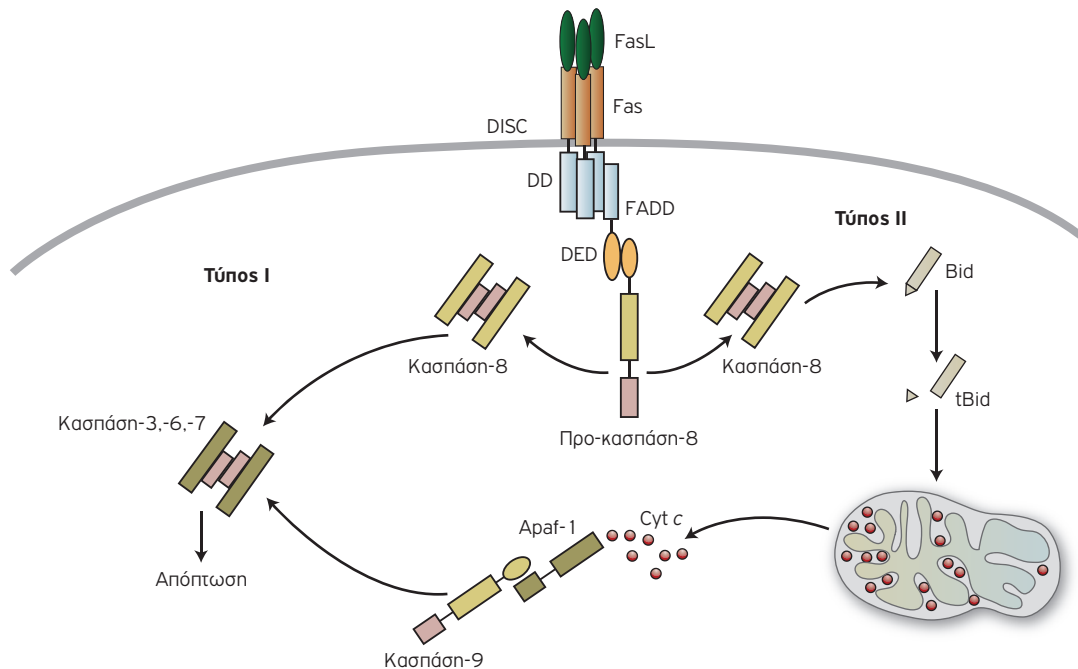
χέων TRAIL-R1/2 συμβάλλει στην ενίσχυση της συσσωμάτωσης των υποδοχέων και το σχηματισμό του συμπλόκου DISC, προκαλώντας έτσι μεγαλύτερη ευαισθησία των κυττάρων στον TRAIL. Επίσης η c-FLIP ρυθμίζεται από διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η προσθήκη νιτρικής ομάδας, η προσθήκη Ub και η φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της c-FLIP_S από την κινάση PKC, π.χ., επιφέρει τη σταθεροποίησή της μειώνοντας την προσθήκη μορίων Ub και ενισχύοντας την αντι-αποπτωτική δράση της. Η κινάση Src φωσφορυλιώνει την κασπάση-8, προλαμβάνει τη θραύση της και παρεμποδίζει την απόπτωση μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas. Οι E3 λιγάσες της Ub CARPs καταστέλλουν τη δράση της κασπάσης-8 και -10 επιφέροντας την προσθήκη μορίων Ub και την αποικοδόμησή τους στα πρωτεασώματα. Συνεπώς η καθοδική ρύθμιση των CARPs ενισχύει την απόπτωση μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου. Η CARP2 προσθέτει επίσης πολλά μόρια Ub στη θέση Lys⁴⁸ της κινάσης RIP1 και προκαλεί την αποικοδόμησή της στα πρωτεασώματα, καταστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ που επάγεται από τον TNFα.

Ακόμη, πολλά μόρια που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς θανάτου, όπως οι IAPs, οι κασπάσες-εκτελεστές και μέλη της οικογένειας Bcl-2 ρυθμίζονται από την προσθήκη μορίων Ub. Αν και η FADD φωσφορυλιώνεται από αρκετές κινάσες δεν είναι ξεκάθαρο αν η φωσφορυλίωση αυτή επηρεάζει τη δράση της στο εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης. Η φωσφορυλίωση της FADD παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η ανακύκλωση της FADD ρυθμίζεται από την προσθήκη μορίων Ub από τη E3 λιγάση της Ub MKRN1, κάτι που επηρεάζει την απόπτωση που επάγεται από τους υποδοχείς θανάτου.

3.4. ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ I ΚΑΙ II

Μετά τη διέγερση των υποδοχέων θανάτου, η έκταση της ενεργοποίησης της κασπάσης-8 από το σύμπλοκο DISC μπορεί να μην είναι επαρκής για την απόπτωση και έτσι το αποπτωτικό σήμα πρέπει να ενισχυθεί και με τη συμμετοχή του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης. Η έκταση της ενεργοποίησης της κασπάσης-8 στο σύμπλοκο DISC καθορίζει ουσιαστικά δύο μηχανισμούς απόπτωσης και δύο τύπους κυττάρων στους οποίους υπάρχουν οι μηχανισμοί αυτοί, τα κύτταρα τύπου I και II.

Στα κύτταρα τύπου I (π.χ., λεμφοκύτταρα, θυμοκύτταρα) η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 είναι επαρκής για την ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών και την ολοκλήρωση της απόπτωσης. Το βήμα αυτό δεν μπορεί



Εικόνα 3.4. Απεικόνιση του εξωγενικού μονοπατιού της απόπτωσης στα κύτταρα τύπου I και τύπου II. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου (π.χ., Fas) από τον αντίστοιχο ligand (π.χ., FasL) προσελκύονται η πρωτεΐνη προσαρμογής FADD και η προ-κασπάση-8, συγκροτώντας το σύμπλοκο DISC. Η ενεργός κασπάση-8 μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα την κασπάση-3 (κύτταρα τύπου I) ή να προκαλέσει τη θραύση της Bid (κύτταρα τύπου II) με αποτέλεσμα τη δημιουργία της tBid. Η tBid μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, προκαλεί MOMP, την απελευθέρωση του Cyt c και το σχηματισμό του αποπτωσώματος. Στο αποπτώσωμα ενεργοποιείται η κασπάση-9 η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών. Από Pereira και Amarante-Mendes, 2011.

να παρεμποδιστεί από την υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, αφού είναι ανεξάρτητο από τα μιτοχόνδρια. Στα κύτταρα τύπου II (π.χ., ηπατοκύτταρα, β-παγκρεατικά κύτταρα), απαιτείται ενίσχυση του αποπτωτικού σήματος για την πλήρη ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών και αυτό επιτυγχάνεται με τη συμμετοχή του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης, μετά τη θραύση της BH3-only πρωτεΐνης Bid από την κασπάση-8. Στην περίπτωση του υποδοχέα TNF-R1 η ενεργοποίησή του μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση της καθεψίνης D μέσω της παραγωγής κεραμιδίου, με αποτέλεσμα η καθεψίνη D να επιφέρει τη θραύση της Bid και την έναρξη του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης. Η απόπτωση στο στάδιο αυτό και πριν την εμφάνιση της MOMP μπορεί να παρεμποδιστεί από την υπερέκφραση της Bcl-2. Αν και το σήμα του κυτταρικού θανάτου που μεταβιβάζεται από τον υποδοχέα Fas μπορεί να διεγείρει το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι και στους δύο τύπους κυττάρων, μόνο ο κυτταρικός τύπος II εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια για την ολοκλήρωση της απόπτωσης. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η υπερέκφραση των Bcl-2 και Bcl-x_L παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των κασπασών-8 και -3 καθώς και την α-

πόπτωση που εξαρτάται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas μόνο στον κυτταρικό τύπο II, αλλά όχι και στον κυτταρικό τύπο I (Εικ. 3.4).

Συγκρίνοντας διαφορετικούς τύπους κυττάρων τύπου I και II βρέθηκε ότι στα κύτταρα τύπου II ο υποδοχέας Fas συγκεντρώνεται στις λιπιδιακές σχεδίες, αλλά πολύ πιο αργά συγκριτικά με τα κύτταρα τύπου I. Το ίδιο παρατηρείται και κατά τη συγκρότηση του συμπλόκου DISC. Αυτό έχει ως συνέπεια την υψηλή συγκέντρωση ενεργοποιημένης κασπάσης-8 στα κύτταρα τύπου I η οποία θα μπορούσε άμεσα να ενεργοποιήσει τις κασπάσεις-εκτελεστές. Αντίθετα, στα κύτταρα τύπου II ο σχηματισμός των συμπλόκων DISC είναι ασθενέστερος και πιο αργός, κάτι που έχει επίδραση και στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και συνεπώς τα κύτταρα χρησιμοποιούν το βρόχο ενίσχυσης του αποπτωτικού σήματος μέσω της πρωτεόλυσης της Bid και της συμμετοχής του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης. Έτσι, οι διαφορές μεταξύ των κυττάρων τύπου I και II μπορεί επίσης να σχετίζονται και με την κινητική μετατόπισης των υποδοχέων Fas στις λιπιδιακές σχεδίες, την εσωτερική τους και την έναρξη μεταγωγής του αποπτωτικού σήματος.

Στα κύτταρα τύπου I ο έλεγχος γίνεται στο επίπεδο του συμπλόκου DISC, όπου οι παρεμποδιστικές πρωτεΐνες cIAPs και c-FLIP_S δεν επιτρέπουν την προσέλκυση της προ-κασπάσης-8 ανταγωνιζόμενες μαζί της για σύνδεση στην περιοχή DED της FADD ή με την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της κασπάσης-8 εντός του συμπλόκου DISC από τη c-FLIP_L. Στα κύτταρα τύπου II ο έλεγχος γίνεται με την παρεμπόδιση της δράσης της tBid από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 ή από τη XIAP η οποία παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9.

Όμως, η κατάσταση φαίνεται ότι είναι πιο πολύπλοκη. Από τη μια πλευρά, η tBid είναι πολύ ισχυρή και διεγείρει τη MOMP, με συνέπεια την πλήρη ενεργοποίηση του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης, ακόμη και όταν η δραστηριότητα της κασπάσης-8 και τα επίπεδα πρωτεόλυσης της Bid είναι χαμηλά. Από την άλλη πλευρά, αυξάνοντας τη δραστηριότητα της κασπάσης-8 (π.χ., ρυθμίζοντας καθοδικά τη c-FLIP) ένα κύτταρο τύπου II δεν μετατρέπεται σε κύτταρο τύπου I. Αυτό μπορεί πιθανόν να αποδοθεί στη δράση της XIAP, η οποία συνδέεται άμεσα και απενεργοποιεί τις κασπάσες-3 και -7 και ασθενέστερα την κασπάση-9. Υψηλά επίπεδα XIAP θα εξασθενίσουν τη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος που επάγεται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas μέσω της παρεμπόδισης των κασπασών-εκτελεστών. Κατά τη MOMP η απελευθέρωση των ανταγωνιστών των IAPs Smac/DIABLO και Omi/HtrA2 θα προκαλέσει την απελευθέρωση των ενεργοποιημένων κασπασών-3 και -7 από τη XIAP. Έτσι, η XIAP αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επιτρέπει τη διάκριση των κυττάρων τύπου I και τύπου II κατά την απόπτωση που επάγεται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas. Συνεπώς, όταν η έκφραση της XIAP είναι χαμηλή ή απουσιάζει εντελώς τα κύτταρα είναι συνήθως τύπου I. Στα κύτταρα τύπου II η έκφραση της XIAP είναι αρκετά υψηλή και απαιτείται η παρουσία της Smac/DIABLO, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, για να αφαιρέσει την παρεμπόδιση της XIAP από τις κασπάσες, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αυτο-καταλυτική ενεργοποίησή τους.

Συμπερασματικά, εάν ένα κύτταρο συμπεριφερθεί ως τύπου I ή τύπου II εξαρτάται, πιθανόν, όχι μόνο από τα επίπεδα μιας απλής πρωτεΐνης, αλλά μάλλον από την αναλογία των ενεργοποιημένων κασπασών-εκτελεστών (κασπάση-3 και -7), των επιπέδων της ελεύθερης XIAP και των υποστρωμάτων των κασπασών που πρέπει να αποικοδομηθούν. Δεδομένης της πολύπλοκης μεταμεταφραστικής ρύθμισης της σταθερότητας και της δραστηριότητας της XIAP, η αναλογία αυτή είναι πιθανόν να υπόκειται σε μεγάλες διακυμάνσεις ως αποτέλεσμα της

έκτασης της κυτταρικής διέγερσης, ακόμη και μέσα στο ίδιο κύτταρο.

3.5. Συμπλοκο DISC

Το σύμπλοκο DISC προάγει την επεξεργασία και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και -10, οι οποίες αποτελούν τις κασπάσες έναρξης του εξωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης. Το σύμπλοκο DISC προκαλεί τη μεταγωγή των σημάτων θανάτου με τρεις τουλάχιστον τρόπους: 1) με την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 η οποία επιφέρει άμεση πρωτεόλυση και ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών, 2) με πρωτεόλυση της BH3-only πρωτεΐνης Bid, μετατόπιση της tBid στα μιτοχόνδρια και πρόκληση MOMP, και 3) με ενεργοποίηση των κινασών RIP1 και JNK, οι οποίες συμβάλλουν στην απόπτωση και με την απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων από τα λυσοσώματα.

Το σύμπλοκο DISC σχηματίζεται μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου που προκαλείται από τη σύνδεση των ligands θανάτου. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλεί την προσέλκυση στην κυτταροπλασματική περιοχή DD του υποδοχέα θανάτου συγκεκριμένων πρωτεϊνών προσαρμογής (TRADD και FADD) οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να προσελκύσουν και άλλες πρωτεΐνες, ανάλογα με το σήμα και το μονοπάτι μεταγωγής του σήματος αυτού. Η FADD αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη η οποία, λόγω της ύπαρξης περιοχών DED (οι οποίες υπάρχουν και στην προ-κασπάση-8 και -10), προσελκύει τις κασπάσες έναρξης κασπάση-8 και -10 (Εικ. 3.5). Οι κασπάσες έναρξης ενεργοποιούνται στο σύμπλοκο DISC λόγω του φαινομένου της επαγόμενης εγγύτητας και της αυτο-επεξεργασίας που υφίστανται.

3.5.1. Πρωτεΐνη προσαρμογής FADD

Για μεγάλο χρονικό διάστημα πιστευόταν ότι η FADD αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς θανάτου Fas και TNF-R1, συμβάλλοντας στην προσέλκυση και την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-8 και στην επακολουθούσα απόπτωση. Αργότερα βρέθηκε ότι η FADD μπορεί να μεταβιβάσει το αποπτωτικό σήμα μετά την ενεργοποίηση και των υποδοχέων θανάτου TRAIL-R1,2. Συνεπώς, η FADD αποτελεί τη βασική πρωτεΐνη προσαρμογής για τη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος από όλους τους υποδοχείς θανάτου. Η FADD αποτελείται από δύο περιοχές, τη DD και τη DED. Η περιοχή DD της FADD συνδέεται με την περιοχή DD του υποδοχέα θανάτου, ενώ η περιοχή DED προσελκύει μέσω ομοτυπικής αλληλεπίδρασης την προ-κασπάση-8 σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο DISC, στο οποίο ενεργοποιείται η κασπάση-8.