

MARZENA ADAMCZYK, GRAŻYNA KOSTKA, DANUTA PALUT

## ROLA APOPTOZY W FIZJOLOGII I PATOLOGII KOMÓRKI

## THE ROLE OF APOPTOSIS IN CELL PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

Zakład Toksykologii Środowiskowej, Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

*Na podstawie piśmiennictwa omówiono zagadnienia dotyczące śmierci komórkowej, a zwłaszcza apoptozy i jej genetycznych uwarunkowań oraz rolę tego procesu w stanach fizjologicznych i patologicznych komórki.*

## WSTĘP

Śmierć komórek jest zjawiskiem fizjologicznym zachodzącym w każdym żywym ustroju. Ustawiczna bowiem wymiana martwych komórek na nowe zachodzi w znacznej większości tkanek i tak pojęta śmierć komórki jest nierozzerwalnie związana z przeciwnym procesem, tj. proliferacją. Śmierć komórek jest również konsekwencją działania czynników patogennych, m.in. cytotoksycznych substancji chemicznych. W patologii nagła śmierć, obejmująca duże zespoły komórek lub tkanek w organizmie określana jest mianem martwicy (nekrozy).

Śmierć komórek nie ogranicza się jednak tylko do nekrozy. Morfologiczne i biochemiczne zmiany w obumierających komórkach dały podstawę do wyróżnienia odrębnego rodzaju śmierci – apoptozy [28, 49, 79].

## NEKROZA A APOPTOZA

Ultrastrukturalne zmiany podczas nekrozy obejmują uszkodzenia wszystkich organelli komórkowych, łącznie z błoną. W początkowych fazach procesu komórka powiększa swoją objętość, ponieważ zachwianie równowagi wodno-elektrolitycznej powoduje bierny napływ jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza komórki oraz zwiększony napływ wody. Nekrozę charakteryzuje więc szybkie pęcznienie komórki wraz z obrzękiem organelli: mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej oraz wakuolizacja cytoplazmy. Jony  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  przemieszczają się do mitochondriów, gdzie hamują proces oksydatywnej fosforylacji (zaburzenia w wytwarzaniu ATP), jednocześnie aktywując proteazy i fosfolipazy. W wyniku odłączenia się rybosomów od szorstkiej siateczki śródplazmatycznej obserwuje się zaburzenia w syntezie białek enzymatycznych i strukturalnych. Chromatyna jądrowa skupia się w postaci agregatów, a jądro obkurcza się i rozpada (karyorrhesis) lub rozpuszcza (karyolysis) [11, 12, 79]. W ostatnim etapie procesu następuje przerwanie błony komórkowej i zawartość komórki wypływa na zewnątrz, wywołując stan zapalny. We wszystkich przypadkach nekrozy – jako pierwsze mają miejsce zakłócenia

syntezy ATP oraz zaburzenia w gospodarce jonowej, zaś uszkodzenie struktury chromatyny jądrowej jest wtórne i ma niespecyficzny przebieg [11].

Apoptoza natomiast, jest procesem genetycznie kontrolowanym, który stanowi aktywną samozagładę nadmiernie liczebnych, niepotrzebnych, bądź wręcz niebezpiecznych dla organizmu komórek. Należy podkreślić, że apoptoza jest przeciwieństwem procesu proliferacji komórek [89]. Apoptoza jest niezbędna m. in. dla utrzymania w organizmie homeostazy liczby komórek, ich struktury oraz poziomu przemian biochemicznych u dorosłych osobników. Termin apoptoza pochodzi z jęz. greckiego i oznacza opadanie płatków kwiatów lub liści z drzew. Wprowadzony został przez *Kerr'a* w 1972 r. dla opisu zjawisk obserwowanej wcześniej programowanej śmierci komórki (PCD – Programmed Cell Death) [40]. W ostatnich latach obserwujemy tendencję do stosowania terminu PCD i apoptoza zamiennie, ponieważ w obu przypadkach programy kontrolowane są genetyczne. Jednakże genetyczny program PCD jest zegarem określającym czas samobójstwa komórek, podczas gdy genetyczny program apoptozy określa molekularne mechanizmy powodujące nagłe, potrzebne samobójstwo komórki [46]. Toteż stosowanie terminów apoptoza i PCD jako synonimów nie jest ścisłe, ponieważ apoptozę często obserwuje się w trakcie PCD zachodzącej w rozwijającym się organizmie (ogon kijanki nie jest potrzebny żabię, przewody *Müllera* u ssaków zachowują się wyłącznie u samic, eliminacja części neuronów w rozwoju układu nerwowego, czy też części komórek mezenchymy w trakcie formowania palców kończyn – eliminowane są fragmenty mezenchymy między palcami), natomiast apoptoza wywołana np. lekami cytostatycznymi – nie jest procesem PCD [67, 71, 76, 83]. Dlatego też należałoby stosować termin PCD dla opisu śmierci komórek podczas embriogenezy i morfogenezy (opisu śmierci planowej), natomiast termin apoptoza – dla opisu zmian genetycznych, morfologicznych i biochemicznych zachodzących w obumierającej komórce pod wpływem różnorodnych czynników endo- i egzogennych [67]. Wg *Schulte-Hermann*a apoptoza stanowi aktywne, genetycznie zakodowane samozniszczenie komórek charakteryzujące się specyficzną morfologią; podczas gdy nekroza jest typem śmierci komórki występującym po rozległym uszkodzeniu komórek lub tkanek, związanym z szybko następującym upośledzeniem głównych funkcji komórki, takich jak ekspresja genów, synteza ATP i potencjał błony [75].

Przejawem apoptozy jest obkurczanie się komórek oraz zaburzenia w organizacji chromatyny (jądrowy DNA + białka), która kondensuje i skupia się w postaci grubych ziarnistości pod błoną jądrową. Jądrowe DNA ulega fragmentacji na odcinki nukleosomalne (ok. 200 par zasad) lub oligonukleosomalne, dające podczas elektroforezy DNA w żelu agarozowym obraz charakterystycznej „drabinki” [36, 50, 62, 89]. Obserwuje się również utratę struktur mikrotubularnych i reorganizację cytoszkieletu – nie jest to jednak warunek konieczny do zajścia apoptozy. Z czasem, dzięki uwypukleniom błony komórkowej, tworzą się tzw. ciała apoptotyczne, zawierające nie naruszone organella komórkowe i fragmenty jądra. Wygląd komórki przypomina pączkowanie. Apoptoza bardzo często dotyczy pojedynczych komórek i w odróżnieniu od nekrozy nie wyzwala stanu zapalnego. Odłączające się bowiem od komórki ciała apoptotyczne szybko ulegają sfagocytowaniu przez monocyty i makrofagi, prawdopodobnie na skutek przekształceń w błonach komórkowych, które umożliwiają komórkom żernym rozpoznać umierającą komórkę lub ciała apoptotyczne: utrata asymetrii fosfolipidowej i prze-

mieszczenie się fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej pozwala na przyłączenie receptora obecnego na komórkach fagocytujących wywołując sygnał do fagocytozy; utrata terminalnych kwasów sialowych z glikoprotein umieszczonych na powierzchni błony wywołuje reakcję N-acetyloglukozoaminy lub N-acetylogalaktozoaminy i galaktozy z receptorem lektynowym makrofagów [72, 73].

Ponadto, w odróżnieniu od nekrozy, komórka ginąca na drodze apoptozy przez stosunkowo długi okres czasu wykorzystuje ATP dla uruchomienia procesów transkrypcji i translacji białek, niezbędnych do rozbicia nici DNA oraz tworzenia wiązań krzyżowych [45] (Tab. I).

Tabela I. Morfologiczna charakterystyka apoptozy i nekrozy

Apoptoza	Nekroza
Śmierć aktywna	Śmierć przypadkowa
1. Obejmuje pojedyncze, rozproszone komórki	1. Obejmuje grupy sąsiadujących komórek
2. Chromatyna skondensowana obwodowo (pierścień)	2. Chromatyna w niewielkim stopniu skupiona na obwodzie
3. Powiększenie jąderka	3. Błona jądrowa utrzymuje nienaruszoną strukturę aż do jej degradacji
4. Pofałdowana błona jądrowa z postępującymi wgłębieniami	4. Spęczenie cytoplazmy we wszystkich kompartmentach komórkowych
5. Cytoplazma spoista, zbita; pojawianie się przejrzystych wakuol oraz zanik mikrokosmków komórkowych	5. Mitochondria i siateczka śródplazmatyczna nabrzmią, matrix mitochondrialna traci gęstość
6. Organelle komórkowe zachowują integralność	6. Zatakowane komórki pękają z uszkodzeniem wszystkich błon; wyciek treści komórki do przestrzeni międzykomórkowej – stan zapalny
7. Obkurczanie komórki na skutek utraty ok. 30% wody	
8. Komórki dotknięte apoptozą tracą kontakt z komórkami sąsiadującymi; powstają ciała apoptotyczne	
9. Brak stanu zapalnego	

#### ENZYMATYCZNE WSKAŹNIKI APOPTOZY

W tworzeniu ciałek apoptotycznych i zapobieganiu wyciekaniu zawartości komórki biorą udział transglutaminazy tkankowe. Przyczyniają się one do usieciowania komórek apoptotycznych w wyniku tworzenia wiązań krzyżowych pomiędzy białkami z udziałem  $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lizyny}$  [16, 45, 78]. W procesie apoptozy, przede wszystkim, uczestniczą jednak inne enzymy. Są nimi:

- endonukleaza DNA, zwana DN-azą I, degradująca DNA na drodze hydrolizy w miejscach łączników nukleosomowych i stąd obraz stereotypowej bocznej „drabinki” nukleosomowych fragmentów DNA,
- topoizomeraza DNA II – prawdopodobnie odpowiedzialna za fragmentację DNA na odcinki ok. 300 par zasad we wczesnych etapach apoptozy,

- postuluje się również udział nukleazy NUC-18 [62, 63].

Aktywacja endonukleaz wymaga obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , natomiast jony  $\text{Zn}^{2+}$  silnie hamują ten proces [2, 4, 48, 50, 78, 86]. W apoptotycznej samozagładzie komórek fragmentacja genomowego DNA wydaje się być zjawiskiem nieodwracalnym, które zmusza komórki do śmierci i występuje przed zmianami w cytoplazmie i w przepuszczalności błony komórkowej – fragmentacja DNA to pierwszy nieodwracalny etap śmierci apoptotycznej [62, 63].

Istnieją jednak przypuszczenia, że rozbitcie DNA wyzwala procesy naprawcze, czego wyrazem jest indukcja poli(ADP-rybozo)polimerazy. Nie można zatem wykluczyć możliwości, że komórka ginie wskutek wyczerpania się zasobów ATP i puli NAD/NADH, w wyniku intensyfikacji procesów naprawy DNA przez poli(ADP-rybozo)polimerazę [81].

### SYGNAŁY INDUKUJĄCE APOPTOZĘ

Pomimo licznych badań nadal niewiele wiadomo na temat dróg przekazywania sygnałów komórkowych prowadzących do uruchomienia programu apoptozy. Aktualne hipotezy zakładają, że komórki giną jeśli nie są pobudzane do przeżycia lub do proliferacji sygnałami z otaczających komórek [1, 12, 66]. Brak specyficznych sygnałów od otaczającego środowiska wyjaśnia np. eliminację na drodze apoptozy komórek o nieprawidłowej lokalizacji – nie docierają bowiem do nich sygnały przeżycia – oraz utrzymanie homeostazy liczby komórek poszczególnych narządów i tkanek. W tym przypadku proliferacja równoważy śmierć.

Apoptozę może wywoływać wiele różnorodnych czynników, zarówno fizycznych, chemicznych, jak i biologicznych. Należy podkreślić, że szereg czynników indukujących sygnały do apoptozy stymuluje również sygnały do proliferacji komórek [33, 51, 66, 71, 80]. Znane obecnie czynniki indukujące śmierć komórek to m.in.: promieniowanie jonizujące i UV,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , szok termiczny, toksyny bakteryjne, substancje niszczące strukturę mikrotubul, inhibitory syntezy białek czy też wolne rodniki tlenowe. Szczególną rolę przypisuje się czynnikom wzrostu z rodziny TNF $\beta$  (Tumor Necrosis Factor – czynnik martwicy nowotworu), TGF $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor $\beta$ 1),  $\beta$ 1neurotransmitterom (np. dopaminie), jonom  $\text{Ca}^{2+}$ , antygenom Fas/APO-1/CD95, glukokortykoidom [41, 47, 67, 74, 75, 81, 82]. O tym czy komórka ulegnie destrukcji na drodze nekrozy, czy też uruchomi program apoptozy decyduje rodzaj czynnika, jego dawka, czas ekspozycji oraz rodzaj komórek [3, 10, 16, 41].

Ostatnio zainteresowanie budzą wolne rodniki tlenowe, powstające podczas metabolizmu komórkowego oraz generowane przez szereg czynników fizycznych i chemicznych. Obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowych przeciwutleniaczy, pełniących rolę zmiataaczy wolnych rodników tlenowych, często czyni komórkę wrażliwą na apoptozę indukowaną wolnymi rodnikami. Wiadomo, że wolne rodniki tlenowe prowadzą do uszkodzeń DNA, które z kolei aktywują wspomnianą już poli(ADP-rybozo)polimerazę, powodując m. in. spadek stężenia ATP. Ponadto wolne rodniki tlenowe prowadzą do peroksydacji lipidów błonowych.

Zidentyfikowano też szereg czynników hamujących apoptozę – są to np. jony  $\text{Zn}^{2+}$ , aminokwasy obojętne, estro- i androgeny, błonowe białko 1 wirusa *Epstein-Barra* oraz związki chemiczne zwane promotorami wzrostu nowotworowego [16, 22, 41, 84].

Bez względu jednak na rodzaj czynników uczestniczących w stymulowaniu programu śmierci – sygnał docierający do komórki aktywuje enzymy zwane proteazami typu ICE (interleukin-1 converting enzyme), następuje fragmentacja białek i zniszczenie komórki. Proteazy typu ICE (kaspazy) to nowa rodzina enzymów uczestniczących w procesie apoptozy. Nazwa pochodzi od pierwszej odkrytej w tej grupie proteazy przekształcającej prekursor interleukiny  $1\beta$  w formę macierzystą. Cytoplazmatyczne proteazy cysteinowe stanowią liczną ( $> 10$ ) grupę białek i wyjaśnienie mechanizmów ich proteolitycznej aktywności stanowi klucz do zrozumienia molekularnych mechanizmów śmierci komórek [7, 12].

### GENY ZWIĄZANE Z PROCESEM APOPTOZY

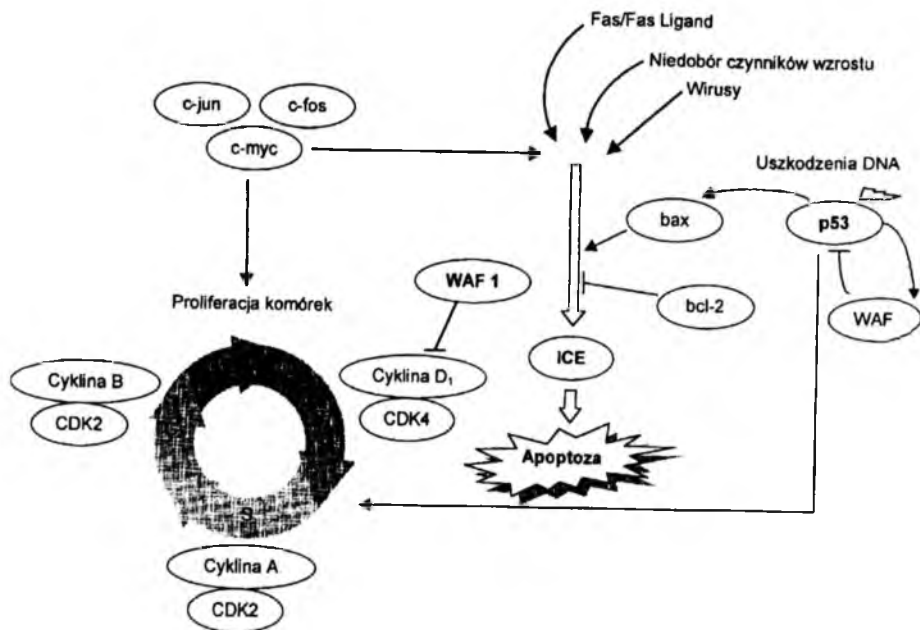
Jak już wspomniano, regulacja apoptozy jest uwarunkowana genetycznie i wymaga ekspresji szeregu niezależnych, ale współdziałających genów. Dotychczas wykazano udział m. in. następujących genów:

- geny ced-3 i ced-4 – pełniących rolę genów śmierci
- rodzina genów bcl-2: Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub>, Mcl-1, A1, ced-9 – hamujących proces apoptozy,
- Bax, Bak, Bad, Bcl<sub>XS</sub> – działających jako promotory apoptozy
- protoonkogeny: c-fos, c-myc, c-jun
- geny supresorowe: p53, Rb [6, 9, 16, 28, 31, 54, 57, 58, 59, 71].

Należy zaznaczyć, że ww. protoonkogeny i geny supresorowe kodują jądrowe fosfoproteiny działające jako czynniki transkrypcji również w kontroli proliferacji i różnicowania komórek. Od pewnego czasu wydaje się zatem oczywiste, że zarówno bodźce stymulujące proliferację, jak też stymulujące apoptozę indukują w komórce zdarzenia, które do pewnego etapu są wspólne dla obu procesów, tj. cyklu komórkowego i śmierci komórki (Ryc. 1).

Produkt ludzkiego protoonkogeny Bcl-2 ulegając ekspresji zapobiega lub opóźnia wystąpienie apoptozy [32, 78]. Białko Bcl-2 występuje w błonie mitochondrialnej, a także w otoczce jądrowej i siateczce śródplazmatycznej wydając się być jednym z najważniejszych sygnałów przeżycia [31, 38, 78]. Postuluje się, że białko Bcl-2 przeciwdziała utlenieniu przez wolne rodniki tlenowe warstwy lipidowej błon komórkowych; wolne rodniki tlenowe niszcząc strukturę błony wywołują jej fragmentację, a następnie apoptozę. Wahania w aktywności białka Bcl-2 uczestniczą w pobudzeniu komórek do proliferacji. Wzmoczona aktywność bcl-2 prowadzi do gromadzenia komórek, które w normalnych warunkach zostałyby wyeliminowane. Wykazano, że białko Bcl-2 współdziała w regulacji apoptozy z białkiem Bax. Białka te tworzą ze sobą kompleksy. Jeśli w komórce jest nadmiar białka Bcl-2, wówczas wiąże ono całą pulę białka Bax (heterodimery Bcl-Bax). Pozostałe białko tworzy homodimery (Bcl-Bcl), pozwalając komórce na przeżycie. Natomiast w przypadku nadmiaru Bax powstające homodimery (Bax-Bax) stymulują komórkę w kierunku śmierci apoptotycznej [81].

Działanie genu bcl-2 reguluje gen supresorowy p53 (antyonkogen). Wzrost ilości białka p53 powoduje spadek ilości Bcl-2, co jest równoznaczne ze stymulacją sygnałów śmierci (prawdopodobnie p53 reguluje aktywnością całej rodziny bcl-2) [6, 43, 57]. W warunkach fizjologicznych, oprócz udziału w apoptozie, gen p53 jest niezbędny w procesach kontroli i regulacji cyklu komórkowego oraz różnicowania komórek [23].



Ryc. 1. Regulacja cyklu komórkowego i apoptozy  
Regulation of cycle cell and apoptosis

Kumulacja białka p53 nie jest wynikiem transkrypcji genu *de novo*, natomiast może być np.: wynikiem odmiennej redakcji transkryptów (splicing alternatywny)<sup>1</sup>, stabilizacji na skutek przetworzeń potranslacyjnych (fosforylacja, oligomeryzacja, tworzenie kompleksów z innymi białkami), czy też redystrybucji p53 w obrębie komórki [88]. Gen p53, często nazywany „strażnikiem genomu”, monitoruje stan zdrowia komórki, integralność chromosomalnego DNA oraz pomyślne zakończenie poszczególnych faz cyklu komórkowego [43]. Wydaje się, że białko p53 odgrywa główną rolę w blokowaniu cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub> (przynajmniej w komórkach z uszkodzonym DNA), ponadto białko p53 może uczestniczyć w kontroli cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub> i M, jak również (za pośrednictwem białka p21) brać udział w regulacji następstwa fazy S i M [88]. Stwierdzono, że białko p53 działa jako czynnik transkrypcji, który wiążąc się ze specyficznymi sekwencjami DNA aktywuje m. in. gen WAF1/CIP1, kodujący białko p21. Białko to jest uniwersalnym inhibitorem enzymów regulujących wejście komórki w poszczególne fazy cyklu podziałowego, tzw. kinaz cyklino-zależnych (CDK – cyclin-dependent kinases). Ponadto białko p21 tworzy kompleksy z podjednostką polimerazy δ DNA (białkiem PCNA). Powstanie kompleksu p21/PCNA blokuje replikacyjną syntezę DNA, nie blokując syntezy reperacyjnej DNA [88]. Produkt genu p53 zapewnia

<sup>1</sup> alternatywny splicing – dla niektórych genów istnieje kilka możliwości składania pierwotnego transkryptu. W wyniku łączenia ze sobą różnych egzonów danego genu powstaje więcej niż jeden rodzaj mRNA.

komórce czas na usunięcie uszkodzeń DNA. W większości przypadków uszkodzenia DNA są szybko korygowane przez sprawnie działające mechanizmy naprawcze, obecne w każdej komórce. Jeżeli jednak system naprawy myli się lub nie potrafi usunąć uszkodzeń DNA – białko p53 uruchamia program śmierci komórki na drodze apoptozy, eliminując nieprawidłową komórkę ze środowiska. Na podstawie doniesień z piśmiennictwa należy wnioskować, iż nie w każdej komórce uruchomienie programu apoptozy uwarunkowane jest ekspresją genu p53. Niemniej jednak *Polyak* i wsp. zaproponowali model apoptozy indukowanej przy udziale p53. W przedstawionym modelu autorzy proponują udział 3 procesów:

- Aktywacja na drodze transkrypcji redoks-zależnych genów
- Powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS-reactive oxygen species)
- Oksydacyjna degradacja mitochondriów i uwalnianie czynników wywołujących śmierć apoptotyczną [65].

Model ten został opracowany na podstawie wyników eksperymentów wskazujących, że gen p53 aktywuje geny, które określono skrótem PIG<sub>s</sub> (p53-induced genes). PIG<sub>s</sub> były aktywowane we wczesnej fazie apoptozy, stosunkowo szybko po ekspresji p53, przynajmniej 12h przed obserwowanymi zmianami morfologicznymi i biochemicznymi. Określenie sekwencji PIG<sub>s</sub> dostarczyło informacji na temat potencjalnej ich funkcji. Kilka z niżej opisanych PIG<sub>s</sub> koduje białka, których aktywność warunkuje status oksydoredukcyjny komórki:

- PIG1 należy do rodziny galektyn (galectin), które mogą stymulować produkcję rodników ponadtlenkowych
- PIG3 jest nowym genem, odpowiadającym genowi TED2, roślinnej NADPH-oksydoreduktazie. Najbliższa TED2 u ssaków jest NADPH-chinon oksydoreduktaza, potencjalny generator ROS
- PIG6 jest homologiem oksydoreduktazy prolinowej – mitochondrialnego enzymu, który katalizuje pierwszy etap konwersji proliny do glutaminianu. Glutaminian jest natomiast jednym z 3 aminokwasów niezbędnych do powstania glutationu, głównego regulatora statusu oksydoredukcyjnego komórki
- PIG7 jest indukowany przez TNF $\alpha$ , induktor stresu oksydacyjnego
- PIG8 stanowi ludzki homolog mysiego genu *Ei24*, którego ekspresja jest indukowana przy udziale p53 przez etoposyd (etoposide), lek cytostatyczny
- PIG12 należy do rodziny genów kodujących mikrosomalną transferazę S-glutationu
- Wyjątek stanowi p21, który bywa rozpatrywany jako PIG, może jednak również być indukowany przez ROS, niezależnie od p53 [65]

Z genem Bcl-2 współdziała, w zależności od typu komórek, również protoonkogen c-myc [15]. Ich wzajemne relacje indukują bądź hamują apoptozę [15]. W komórkach stymulowanych do apoptozy obserwuje się również aktywację protoonkogenów c-fos i c-jun. Produkty tych genów – białko Fos i Jun tworzą czynnik transkrypcyjny AP-1, który w jądrze komórki wiążąc się ze specyficznymi sekwencjami DNA może aktywować geny uczestniczące w programie śmierci; czynnik AP-1 uczestniczy również w proliferacji komórek.

Spośród 3 genów: ced-3, ced-4 oraz ced-9 występujących u nicienia *Caenorhabditis elegans*, u ssaków stwierdzono obecność homologów dla ced-3 i ced-9. Geny ced-3

i ced-4 są bezpośrednio związane ze śmiercią apoptotyczną, podczas gdy gen ced-9 działa antagonistycznie w stosunku do proapoptotycznej roli genów śmierci ced-3 i ced-4 [25, 26, 27]. Zidentyfikowane u nicienia białko Ced-9 należy do rodziny regulatorów śmierci komórkowej Bcl-2, podczas gdy produkt genu ced-3 – jest homologiem proapoptotycznych proteaz cysteinowych (kaspaz), występujących u ssaków. Ced-4 koduje natomiast białko, które nie wykazywało podobieństwa do znanych dotychczas białek występujących u ssaków

Badania *Reed'a* wykazały, że Ced-4 może tworzyć kompleksy zarówno z Ced-9 jak i Ced-3 [68]. Obserwacje te przemawiają za modelem, w którym białko Ced-9 zapobiega śmierci komórkowej, wiążąc się bezpośrednio z kompleksem Ced-4/Ced-3, przypuszczalnie utrzymując go w nieaktywnej konformacji. W komórkach otrzymujących sygnał stymulujący śmierć kompleks, zwany apoptozomem, może dysocjować uwalniając białka śmierci Ced-4/Ced-3 [25, 68]. Wydaje się uzasadnione przypuszczenie *Chinnaiyan'a* [8], że Ced-4 wykazuje aktywność ATP-azy, pomimo że do chwili obecnej nie wykazano hydrolizy ATP. Hipoteza ta zakłada, że proces hydrolizy ATP dostarcza energii koniecznej do zmian strukturalnych i autokatalitycznej aktywacji Ced-3, o ile aktywacja ta nie jest hamowana przez białko Ced-9 [8, 25]. Niezwykle pomocne okazało się wyizolowanie z komórek ssaków 3 apoptotycznych czynników aktywacji proteaz Apaf, (apoptosis protease-activating factors), które wspólnie wydają się aktywować przetwarzanie kaspazy-3, zachodzące w obecności deoksyrybozy-ATP. Można zatem wnioskować, że białka Apaf, są występującym u człowieka funkcjonalnym odpowiednikiem Ced-4. Zaskakujące są jednak wyniki badań wskazujące, iż Apaf-2 jest cytochromem c – białkiem uczestniczącym w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów [25]. Prawdopodobnie więc w komórkach przeznaczonych do śmierci, cytochrom c przemieszcza się z mitochondriów do cytozolu, gdzie w obecności ATP aktywuje kaspazy.

*Zou* i wsp. wykazali, że białka Apaf-1, Ced-3 i Ced-4 posiadają w swojej sekwencji tzw. domenę rekrutacji kaspaz (CARD – caspase-recruitment domain), która może wiązać się bezpośrednio z kaspazami [91]. Domena ta prawdopodobnie stanowi połączenie między Apaf i kaspazą-3. Co więcej – karboksylowy koniec łańcucha polipeptydowego Apaf-1 posiada powtarzające się sekwencje aminokwasów WD-40. Takie powtórzenia na ogół pośredniczą w interakcji białko-białko i w tym przypadku mogą pośredniczyć w interakcji pomiędzy Apaf-1 i Apaf-2 (cytochrom c) [91].

Fakt, że Ced-4 aktywuje Ced-3, a Apaf-1 – kaspazy sugeruje, że molekularne mechanizmy działania tych białek mogą być takie same. Regulacja oddziaływania Apaf-1 jest prawdopodobnie tylko bardziej złożona, ponieważ komórki ssaków muszą zintegrować o wiele więcej sygnałów zanim zapadnie decyzja czy komórka ma żyć dalej, czy popełnić samobójstwo. Pomimo licznych badań precyzyjne mechanizmy procesu apoptozy nie zostały w pełni wyjaśnione i szereg zagadnień z tego zakresu czeka na rozwiązanie. *Hengartner* [25] np. poddaje w wątpliwość:

- Czy Apaf-1, podobnie jak Ced-4, jest regulowany przez integrację z genami rodziny Bcl-2? Jeśli tak, to czy wykazuje jakiegokolwiek preferencje w stosunku do różnych członków tej rodziny?
- Czy Apaf-1 stanowi jedyny mechanizm, który prowadzi do aktywacji kaspazy-3? U *C. elegans* tak z pewnością jest, ponieważ przy braku Ced-4 nie następuje śmierć



komórek. Wywołanie tak gwałtownego skutku u ssaków wydaje się mało prawdopodobne, np. z powodu alternatywnych dróg aktywacji.

- Poza tym czy każda kaspaza ma własny homolog Apaf-1, czy też mają wspólny aktywator, bądź też są uaktywniane przez inne kaspazy (legendarna kaskada kaspazowa) [25]?

Ostatnio badania nad apoptozą koncentrują się na roli mitochondriów w inicjowaniu mechanizmów śmierci, ponieważ organella te są głównym źródłem reaktywnych form tlenu (ROS – reactive oxygen species). Jak już wspomniano obecnie zakłada się, że ROS i powodowany przez nie stres oksydacyjny pośredniczy w apoptozie. Wielu autorów łączy więc w apoptozie rolę mitochondriów ze stresem oksydacyjnym. Wykazano bowiem, że we wczesnej fazie śmierci apoptotycznej, poprzedzającej fragmentację DNA, w wielu komórkach występuje spadek wartości transbłonowego potencjału mitochondrialnego i otwarcie megakanalu mitochondrialnego (Permeability Transition Pore). Przez otwarte kanały mitochondrialne uwalniane są do cytoplazmy substancje o m. cząst. < 1,5 kD, w tym tzw. AIF (apoptosis inducing factor) o aktywności proteazowej oraz cytochrom c. Te dwa białka są zdolne do indukowania apoptozy w izolowanych jądrach komórek, jednak w nie wyjaśniony dotychczas sposób. Czy mitochondria kontrolując apoptozę działają we wszystkich umierających komórkach – rozstrzygną dalsze badania – bowiem nie we wszystkich komórkach ulegających apoptozie wykazano podwyższony poziom ROS, jak również uszkodzenia oksydacyjne. Trudno też w obecnej chwili jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie czy stres oksydacyjny indukuje apoptozę, czy też jest następstwem procesów prowadzących do jej zajścia [30].

Jak podaje *Kroemer*, a za nim *Kopeć-Szlęzak*, apoptoza może być regulowana na 4 etapach:

- przez bezpośrednie działanie związków na czynniki indukujące apoptozę na powierzchni komórki (np. blokowanie odpowiednich receptorów)
- przez działanie hormonów lub cytokin
- przez blokadę transdukcji sygnałów w komórce
- przez hamowanie procesów katabolicznych w komórce

Jednak ingerencja ta jest możliwa wyłącznie do czasu, gdy procesy apoptotyczne nie uruchomiły reakcji katabolicznych w komórce, co wiąże się z przekroczeniem tzw. punktu nieodwracalnego z drogi komórki do jej śmierci (point of no return) [11, 41, 42, 87].

## ROLA APOPTOZY W FIZJOLOGII I PATOLOGII ORGANIZMU

Zasięg apoptozy jest szeroki i obejmuje zarówno komórki prawidłowe jak i patologiczne. Pomijając rolę apoptozy podczas embriogenezy i metamorfozy należy podkreślić jej znaczenie dla zachowania homeostazy liczby komórek, ich struktury oraz poziomu przemian biochemicznych u dorosłych osobników. Na drodze apoptozy zachodzi np. selekcja tymocytów w grasicy, atrofia w tkankach hormono-zależnych. Ponadto apoptozę obserwujemy w układzie odpornościowym – w przypadku niektórych chorób wirusowych i procesach autoagresji oraz podczas niedokrwiennych ataków serca,

udarów i w procesie nowotworowym, gdzie zjawisko apoptozy budzi coraz więcej nadziei.

W grasicy, selekcji na drodze apoptozy, podlegają tymocyty charakteryzujące się albo zbyt wysokim powinowactwem receptora TCR (T-cell receptor) do antygenów MHC klasy I i II i mogą wywołać reakcję autoagresji, albo tymocyty, których TCR nie wykazują powinowactwa do MHC – a więc nie rozpoznające obcych antygenów [12, 13, 18]. Eliminowane są również limfocyty posiadające na swej powierzchni zarówno receptory CD4+ (charakterystyczne dla limfocytów pomocniczych), jak i CD8+ (charakterystyczne dla limfocytów cytotoksycznych i supresorowych), bądź też nie mają żadnego z nich. Eliminacja ta jednak nie jest pełna [12, 14, 85].

Z kolei – uważa się, że indukcja apoptozy przez wirus HIV w zdrowych limfocytach T pomocniczych wpływa na obniżenie odporności u chorych na AIDS. Śmierć pomocniczych limfocytów T pociąga za sobą samozagładę limfocytów T cytotoksycznych, które przed apoptozą chronią czynniki wzrostu wydzielane przez limfocyty pomocnicze. Wraz z obniżeniem puli limfocytów – spada zdolność organizmu do zwalczania infekcji wirusowych i pasożytniczych [12, 19, 52, 90]. Doniosłą rolę odgrywa tu antygen Fas, eksponowany przez limfocyt pobudzony przez białko GP120, uwalniane przez HIV [12, 39, 82]. Ekspresja antygeny Fas i wiązanie Fas przez ligand Fas (FasL) innego limfocytu lub też wytworzonego przez limfocyt macierzysty prowadzi do śmierci apoptotycznej. Regulacja apoptozy przez Fas-FasL budzi coraz więcej nadziei, szczególnie iż pojawiły się doniesienia, że może zachodzić bez udziału jądra komórkowego, a jedynie dzięki informacji genetycznej zawartej w cytoplazmie [53].

Należy zaznaczyć, że choroby wirusowe w szczególnym stopniu wykazują powiązanie z zaburzeniami apoptozy. Szereg wirusów wykształciło bowiem zdolność hamowania tego procesu w zainfekowanych przez siebie komórkach. Np. wirus *Epstein-Barra* (mononukleozą, chłoniaki u ludzi) produkuje białko zbliżone do Bcl-2 (nadmiar Bcl-2 hamuje apoptozę) oraz substancje stymulujące produkcję Bcl-2 gospodarza. Inne wirusy degradują białko p53, bądź też wytwarzają inhibitory proteaz typu ICE (kaspaz). Działalność ta jest ściśle zaprogramowana – wirus nie hamuje syntezy wszystkich białek, ponieważ spowodowałoby to natychmiastową śmierć komórek (a co za tym idzie i wirusa), a jedynie osłabia reakcje obronne organizmu [16, 22, 24, 36].

O ile w chorobach wirusowych apoptoza jest hamowana, to w udarach i niedokrwienych atakach serca stanowi przyczynę śmierci znacznej liczby komórek, większej niż wynika to z uszkodzenia narządu. Apoptozę tę indukują wolne rodniki uwalniane przez komórki odczynu zapalnego oraz uwalniane z komórek endogenne związki chemiczne (np. glutaminian). W tym przypadku apoptoza jest procesem niebezpiecznym.

Apoptoza wydaje się być również przyczyną śmierci neuronów w chorobach: *Alzheimera*, *Parkinsona* czy *Huntingtona*, jednakże do chwili obecnej nie poznano satysfakcjonującej etiologii tych schorzeń [12].

## ROLA APOPTOZY W PROCESIE NOWOTWOROWYM

Szczególną rolę przypisuje się apoptozie w rozwoju procesu nowotworowego. Ogólnie wiadomo, że organizm buduje komórki w pełni zróżnicowane, które dawno przestały się dzielić, np. komórki układu nerwowego jak też komórki, które nie przestają

się dzielić do końca życia organizmu – komórki macierzyste szpiku kostnego oraz komórki nabłonkowe. Równowaga pomiędzy komórkami proliferującymi a umierającymi zapewnia homeostazę i zachwianie tej równowagi może prowadzić do przerostu tkanki, obserwowanego w chorobach nowotworowych. Choroba nowotworowa rozwija się wskutek nagromadzenia się w prawidłowej komórce licznych i niezależnych mutacji w genach kontrolujących jej wzrost i różnicowanie [23, 33, 34]. Ostatnio naukowcy coraz częściej opisują raka jako chorobę obejmującą zarówno nadmierną proliferację komórek, jak i utratę ich zdolności do umierania na drodze apoptozy – rozpatrywanej jako jeden z ważniejszych mechanizmów chroniących organizm przed rozwojem nowotworów. Proces nowotworowy jest zjawiskiem wieloetapowym, obejmującym co najmniej etap inicjacji, promocji, progresji i inwazji [60]. Udowodniono, że środowiskowe substancje chemiczne, w zależności od właściwości, mogą być inicjatorami procesu nowotworowego bądź też wspomagać rozwój raka na etapie promocji [60, 61]. Zgodnie z ostatnimi poglądami czynniki inicjujące proces nowotworowy wywołują zmiany w materiale genetycznym pojedynczej komórki; zmiany te dotyczą różnego rodzaju mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych, sterujących prawidłowym przebiegiem proliferacji [23, 34]. Konsekwencją tych zmian jest powstanie klonu komórek obdarzonych selektywną przewagą wzrostu w stosunku do komórek sąsiadujących. Potencjalnymi inicjatorami procesu nowotworowego są zatem substancje chemiczne posiadające zdolność do uszkodzania struktury DNA i indukowania mutacji. Dzielące się komórki eukariotyczne zawierające uszkodzenia w DNA realizują jednak strategię polegającą na blokowaniu cyklu komórkowego do czasu usunięcia uszkodzeń w materiale genetycznym. Natomiast gdy system naprawy myli się lub nie potrafi usunąć uszkodzenia DNA, komórka zostaje wyeliminowana ze środowiska na drodze śmierci apoptotycznej. Taka strategia umożliwia zachowanie integralności materiału genetycznego i w konsekwencji zabezpiecza przed potencjalnym ryzykiem dla całego organizmu, jednakże jest ona możliwa pod warunkiem, że komórka posiada sprawnie funkcjonujący gen p53 [88]. Wadliwe, zmutowane cząsteczki p53 zezwalają komórce zarówno na przeżycie z uszkodzonym DNA, jak również na jego replikację. W konsekwencji taka komórka przekazuje uszkodzenie w materiale genetycznym komórkom potomnym w postaci trwałej mutacji. Zainicjowana nowotworowo komórka (kom. preneoplastyczna) żyje tylko po to, aby w następnych etapach rozwoju raka (promocji i progresji) gromadzić mutacje w protoonkogenach i genach supresorowych, umożliwiając nie kontrolowane podziały i nabywanie zdolności do przerzutowania. W poprzednim artykule [61] szczegółowo omówiono mutacje w protoonkogenach oraz w genie supresorowym p53, zidentyfikowane w nowotworach u myszy i szczurów po narażeniu na kancerogeny genotoksyczne. Zacytowano prace, z których jednoznacznie wynika, że m.in. aflatoksyna B<sub>1</sub>, benzo(a)piren, 1,3-butadien, N-nitrozozwiązki oraz chlorek metylenu – nieczynniają gen p53 na drodze różnego typu mutacji [61].

Połowa wszystkich ludzkich nowotworów charakteryzuje się wzmożoną aktywnością protoonkogenów oraz brakiem białka p53 lub występowaniem jego nieaktywnych odmian. Ponadto liczne nowotwory cechuje podwyższony poziom białka bcl-2 i obniżony poziom Bax, co może sugerować, że komórki nowotworowe stają się niewrażliwe na sygnały normalnie prowadzące do śmierci apoptotycznej.

Jak już wspomniano – szereg środowiskowych substancji chemicznych, w tym również leków, zakwalifikowano do tzw. promotorów wzrostu nowotworowego, które wyzwalają lub przyspieszają ekspresję fenotypu nowotworowego oddziałując na etapie promocji [20, 61]. Promotory wzrostu nowotworowego nie wykazują działania genotoksycznego, ale jednocześnie są zdolne do stymulowania proliferacji komórek, rozpatrywanej jako czynnik sprzyjający klonalnej ekspansji zainicjowanych komórek oraz hamowania apoptozy.

Do najlepiej opisanych promotorów raka należą promotory raka skóry – estry forbolu oraz promotory raka wątroby z grupy tzw. proliferatorów peroksysomów oraz induktorów cytochromu P-450. Związki te działają na zasadzie mechanizmu receptorowego. Proliferatory peroksysomów aktywują u gryzoni receptor jądrowy zw. Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR $\alpha$ ) chlorowane dioksyny oraz nieplanarne polichlorowane bifenyle – z grupy induktorów form molekularnych cytochromu P-4501A – wiążą się z cytoplazmatycznym receptorem zwanym Ah (Aryl Hydrocarbon Receptor) [21, 35, 44, 77]. Związki należące do induktorów form molekularnych cytochromu P-4502B, np. fenobarbital oraz pestycydy chloroorganiczne – działają prawdopodobnie również na zasadzie mechanizmu receptorowego, jednakże do tej pory nie zidentyfikowano odpowiedniego receptora dla tej grupy związków [77]. Wydaje się, że PPAR $\alpha$  i receptor Ah uczestniczą zarówno we wzmożonej proliferacji hepatocytów, jak też w hamowaniu apoptozy komórek w odpowiedzi na oddziaływanie odpowiednio proliferatorów peroksysomów i induktorów form molekularnych cytochromu P-4501A [64,69]. Stwierdzono, że proliferatory peroksysomów hamują apoptozę hepatocytów indukowaną TGF $\beta$ 1 oraz antygenem Fas [17]. Obserwacje te sugerują zatem, że pochodne tego typu uniemożliwiają czynnikowi wzrostu oraz białku Fas przekazanie sygnału do mechanizmu śmierci, bądź też przeciwdziałają powstaniu ligandu Fas.

Sugeruje się również, że proliferatory peroksysomów hamują apoptozę hepatocytów uwalniając, za pośrednictwem PPAR $\alpha$ , z komórek *Kupffera* – TNF $\alpha$  [70]. 2,4,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioksyna moduluje apoptozę tymocytów przy udziale receptora Ah w warunkach *in vivo* i *in vitro*. W dwustopniowym modelu kancerogenezy inicjowanej czynnikami genotoksycznymi – dioksyna hamuje apoptozę preneoplastycznych hepatocytów na etapie promocji w wyniku negatywnej ekspresji genu p53 [35]. Nikotyna – promotor raka płuc – aktywuje kinazę białkową MAP (Mitogen Activated Protein) oraz kinazę białkową C (PKC) uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w ludzkich komórkach raka płuc, wywołując ekspresję genu bcl-2 i w konsekwencji hamowanie apoptozy komórek rakowych [29]. Od dawna wiadomo, że etap promocji jest odwracalny, po przerwaniu stosowania promotora wzrostu nowotworowego hiperplastyczny wzrost narządu cofa się na skutek apoptotycznej śmierci komórek preneoplastycznych.

Badania wpływu środowiskowych substancji chemicznych na apoptozę komórek zostały zapoczątkowane, można zatem mieć nadzieję, że dalsze osiągnięcia w tym zakresie przybliżą nam zrozumienie roli, jak i molekularnych podstaw oddziaływania związków chemicznych na proces apoptozy.

Omawiając rolę apoptozy w procesie nowotworowym nie można pominąć faktu, że komórki, które uległy pełnej transformacji nowotworowej wciąż mogą być skierowane na drogę apoptozy. W tym przypadku szybka aktywacja procesu apoptozy w komórkach

nowotworowych, w momencie gdy opuszczają rodzimą tkankę guza, zapewne prowadzi do zniszczenia wielu przerzutujących komórek – zanim jeszcze mają szansę na zasiedlenie się w nowym miejscu (etap inwazji). Wiele jednak komórek nowotworowych wymyka się spod kontroli mechanizmów indukujących apoptozę.

Proces apoptozy budzi ogromne nadzieje w zapobieganiu chorobom nowotworowych. Wg *Schulte-Hermann* również etap inicjacji, dotychczas powszechnie uznawany za nieodwracalny, może się cofać w wyniku apoptozy zainicjowanych nowotworowo komórek. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskano w tym zakresie po zastosowaniu TGFβ1 na hepatocytach szczura *in vivo*. Skuteczność TGFβ1 w wywołaniu apoptozy w wątrobie szczurów była wyjątkowo wysoka po zaprzestaniu podawania promotorów wzrostu nowotworowego: octanu cyproteronu (CPA) czy fenobarbitalu [5]. Najwyraźniej skuteczność ta wzrasta w przypadku komórek przygotowanych do apoptozy przez nieznaną sygnalę generowaną w trakcie stosowania mitogenów lub podczas hiperplazji [55, 56, 74]. Niestety wyniki uzyskane na ludzkich hepatocytach nie są jednoznaczne [37, 75].

Wiadomo też, że komórki nowotworowe w wyniku terapii izotopowej umierają głównie w wyniku apoptozy często na skutek aktywacji szlaku zależnego od białka p53. Badania procesu apoptozy pozwoliły też na wyjaśnienie dlaczego tak wiele nowotworów jest opornych na działanie czynników terapeutycznych. Okazało się, że komórki w których brak jest białka p53 lub które wykazują wysoki poziom białka Bcl-2 – mogą stać się odporne na terapię przeciwnowotworową. Naukowcy wprowadzają zatem obecnie terapię genową, pozwalającą na wyeliminowanie oporności na apoptozę. Do komórek nowotworowych, w których gen p53 występuje w zmutowanej formie wprowadza się jego prawidłowe wersje, zmuszając komórki nowotworowe do produkcji funkcjonalnego białka p53 i w konsekwencji do śmierci apoptotycznej. Inne obiecujące podejście polega na blokowaniu specyficznych czynników wzrostu, które są odpowiedzialne za przeżycie komórek nowotworowych oraz blokady telomerazy. Enzym telomeraza systematycznie odbudowuje segmenty telomerów, które podczas normalnych cykli komórkowych są odcinane (telomeraza katalizuje replikację telomerów na matrycy RNA). W efekcie komórka zyskuje nieśmiertelność i jej zdolność do kumulowania mutacji wzrasta.

Śmierć komórek może występować przynajmniej na dwa różne sposoby: na drodze nekrozy lub apoptozy. Pierwszy z nich jest rozpatrywany jako wynik ostrego uszkodzenia komórki, drugi zaś może występować w różnych okolicznościach – podczas których patologiczne czynniki są obecne lub nie, jak np. embriogeneza, metamorfoza czy podczas wymiany komórek w tkankach proliferujących, takich jak np. nabłonki. Wydaje się, iż ten typ śmierci komórkowej może odgrywać kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego w wielu organach i tkankach, różnica zaś między nekrozą a apoptozą zdaje się sprowadzać do aktywacji informacji genetycznej, syntezy DNA i białek, a efekt końcowy zależy od dawki, rodzaju komórki i ekspozycji na dany czynnik.

## Marzena Adamczyk, Grażyna Kostka, Danuta Palut

## THE ROLE OF APOPTOSIS IN CELL PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

## Summary

The cell death is a natural physiological process that occurs in every living organism. It is clear that programmed cell death – apoptosis – is an important mechanism maintaining cell number in a multicellular organism. This review summarises recent progress in the field of apoptosis. Extracellular signals, such as various growth factors and antigene Fas ligand can trigger apoptosis via cell surface receptors. Within the cell the tumor supressor gene p53 and oncogenes c-myc, c-fos and c-jun tend to activate apoptosis, while other genes such as most members of the bcl-2 family, tend to suppress it. Many of these signals regulate a family of cysteine proteases – related to interleukine 1 $\beta$  converting enzyme (ICE) – caspases – which play a crucial role in apoptosis. Many factors that affect apoptosis also affect the cell cycle. For example, p53 appears to be an important mediator of both apoptosis and cycle arrest. If DNA damage is repaired during cycle arrest, the cell survives. Special attention is paid to the abnormalities in the regulation of apoptosis that may contribute to different pathogenic processes.

## PIŚMIENNICTWO

1. Allen P.D., Bustin S.A., Newland A.C.: The role the apoptosis (PCD) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev.* 1993, 7, 63–73.
2. Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H.: Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 1990, 136, 593–608.
3. Arends M.J., Wyllie A.H.: Apoptosis. Mechanism and role in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1991, 32, 223–254.
4. Barbieri D., Troiano L., Grassilli E., Agnesini C., Cristofalo E.A., Monti D., Capri M., Cossarizza A., Franceschi C.: Inhibition of apoptosis by zinc: a reappraisal. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 1992, 187, 1256–1261.
5. Bursch B., Lauer B., Timmerman-Trosier J., Barthel G., Achuppler J., Schulte-Hermann R.: Controlled death (apoptosis) of normal and preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 1984, 5, 435–458
6. Caelles C., Helmbert A., Karin M.: p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994, 370, 220–223.
7. Chhanabhai M., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Reed J.C., Gascoyne R.D.: Immunohistochemical analysis of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme/Ced-3 family protease. *Blood* 1997, 90, 2451–2455.
8. Chinaiyan A.M., Chaudhary D., O'Rourke K.: Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 1997, 388, 728–729.
9. Clarke A.R., Purdie C.A., Harrison D.J., Morris R.G., Bird C.C., Hooper M.L., Wyllie A.H.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993, 362, 849–852.
10. Cohen J.J.: Apoptosis. *Immunol. Today* 1993, 14, 126–130.
11. Corcoran G.B., Sidharth D.R.: The role of the nucleus and other compartments in toxic cell death produced by alkylating hepatotoxications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992, 113, 167–183.
12. Duke R.C., Ojcius D.M., Young J.D.E.: Śmierć komórki w zdrowiu i chorobie. *Świat Nauki* 1997, 66, 24–32.
13. Ezine S., Ceredig R.: Haemopoiesis and early T-cell differentiation. *Immunol. Today* 1994, 15, 151–154.

14. *Falkiewicz B., Liberek B.*: Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej klasy I. Post. Bioch. 1996, 42, 41–48.
15. *Fanidi A., Harrington E.A., Eran G.I.*: Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 protooncogene. Nature 1992, 359, 849–852.
16. *Fesus L., Davies P.J.A., Piacentini M.*: Apoptosis: molecular mechanism in programmed cell death. Europ. J. Cell Biol. 1991, 56, 170–177.
17. *Gill J.H., James N.H., Roberts R.A., Dive C.*: The non-genotoxic hepatocarcinogen – nafenopin supresses rodent hepatocyte apopyosis induced by TGFβ1, DNA damage and Fas. Carcinogenesis 1998, 19, 299–304.
18. *Golstein P., Ojcius M., Ding J., Young E.*: Cell death mechanisms and the immune system. J. Exp. Med. 1991, 121, 29–65.
19. *Gougeon M.L., Montagnier L.*: Apoptosis in AIDS. Science 1993, 260, 1269–1270.
20. *Grasso P., Hinton*: Evidence for and possible mechanism of non-genotoxic carcinogens in rodent liver. Mut. Res. 1991, 248, 271–291
21. *Green S.*: PPAR: a mediator of peroxisome proliferators action. Mut. Res. 1995, 333, 101–109
22. *Gregory C.D., Dive C., Henderson S., Smith C.A., Williams G.T., Gordon J., Rickinson A.B.*: Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. Nature 1991, 349, 612–614.
23. *Hartozińska-Szmyrka A.*: Nowotwory jako choroba genów. Post. Bioch. 1995, 41, 7–15.
24. *Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F., Longnecker R., Kieff E., Rickinson*: Induction of Bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein protects infected B cells from programmed cell death. Cell 1991, 65, 1107–1115.
25. *Hengartner M.O.*: CED-4 is a stranger no more. Nature 1997, 388, 714–715.
26. *Hengartner M.O., Ellis R.E., Horvitz H.R.*: *Caenorhabditis elegans* gene CED-9 protects cells from programmed cell death. Nature 1992, 356, 494–498.
27. *Hengartner M.O., Horvitz H.R.*: Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in domain conserved in Bcl-2. Nature 1994, 369, 318–320.
28. *Hermeking H., Eick D.*: Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. Science 1994, 265, 2091–2092.
29. *Heusch W.L., Maneckjee R.*: Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. Carcinogenesis 1998, 19, 551–556.
30. *Hirsch T., Marzo I., Kroemer G.*: Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. Biosci. Rep. 1997, 17, 67–76.
31. *Hockenbery D.M., Nunez G., Millman C.L., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J.*: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990: 348, 334–336.
32. *Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X-M, Millman C.L., Korsmeyer S.J.*: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 1993, 75, 241–251.
33. *Horst A.*: Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. Post. Biol. Kom. 1992, 19, 3–22.
34. *Horst A.*: Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego. Post. Biol. Kom. 1993, 20, 213–329.
35. International Agency for Resrarch on Cancer. IARC Monographs on the Evolution of Carcinogenic Risk to Humans. 1997, 69, 33–342.
36. *Isaacs J.T.*: Role of PCD in Carcinogenesis: Environ. Health Perspect. 1993, 101(Suppl 5), 27–34.
37. *Itoh N.S., Ishi A., Yonehara M., Mizushima S.I., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S.*: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis. Cell 1991, 66, 233–243.

38. *Jacobson M.D., Burne J.F., King M.P., Miyashita T., Reed J.C., Raff M.C.*: Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993, 361–368.
39. *Kabelitz D., Pohl T., Pechold K.*: Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol. Today* 1993, 14, 338–339.
40. *Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R.*: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer.* 1972, 26, 239–257.
41. *Kopeć-Szlezak J.*: Czynniki regulacyjne apoptozy. *Post. Biol. Kom.* 1996, 23, 445–456.
42. *Kroemer G., Martinez C.*: Pharmacological inhibition of programmed lymphocyte death. *Immunol. Today* 1994, 15, 235–242.
43. *Lane D.P.*: p-53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358, 15–16.
44. *Luebeck E.G., Moolgavkar S.H., Buchmann A., Schwartz M.*: Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: quantitative analysis of enzyme-altered foci. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1991, 111, 469–484.
45. *Manteuffel-Cymborowska M.*: Nowy aspekt metabolizmu poliamin – postranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy. *Post. Bioch.* 1993, 39, 118–126.
46. *Majno G., Joris I.*: Apoptosis, oncosis, and necrosis – an overview of cell death. *Am. J. Path.* 1995, 146, 3–15.
47. *Mannik J.B., Miao X.Q., Stamler J.S.*: Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 24125–24128.
48. *Marikainen P., Isaacs J.T.*: Role of calcium in the programmed death of rat prostate glandular cells. *Prostate* 1990, 17, 175–188.
49. *Martin S.J.*: Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends in Cell. Biol.* 1993, 3, 141–144.
50. *McConey D.J., Orrenius S., Jondal M.*: Cellular signalling in PCD (apoptosis). *Immunol Today* 1990, 11, 120–121.
51. *McConey D.J., Orrenius S.*: Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends in Cell. Biol.* 1994, 4, 370–374.
52. *Meyaard L., Otto S.A., Jonker R.R., Mijster M.J., Keet R.P.M., Miedema F.*: Programmed death of cells in HIV-1 infection. *Science* 1992, 257, 217–219.
53. *Nagata S., Goldstein*: The Fas death factor. *Science* 1995, 267, 1449–1455.
54. *Nunez G., Clarke M.F.*: The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends in Cell. Biol.* 1994, 4, 399–403.
55. *Oberhammer F., Pavelka M., Sharma S., Tiefenbacher R., Purchio T.A., Bursch W., Schulte-Hermann R.*: Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Proc. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5408–5412.
56. *Oberhammer F., Bursch W., Tiefenbacher R., Froschl T.G., Pavelka M., Purchio T., Schulte-Hermann R.*: Apoptosis is induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* 1993, 18, 1238–1246.
57. *Oren M.*: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Methast. Rev.* 1992, 11, 141–148.
58. *Osborne B.A., Schwartz L.M.*: Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell. Biol.* 1994, 4, 394–399.
59. *Owens G.P., Cohen J.J.*: Identification of genes involved in programmed cell death. *Cancer Methast. Rev.* 1992, 11, 149–155.
60. *Palut D.*: Proliferacja peroksyosomów a proces hepatokancerogenezy. *Roczn. PZH* 1997, 48, 1–11.
61. *Palut D., Kostka G., Adamczyk M.*: Molekularne mechanizmy kancerogenezy chemicznej. *Roczn. PZH* 1998, 49, 35–54.
62. *Peitsch M.C., Mueller C., Tschopp J.*: DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucl. Acids Res.* 1993, 21, 4206–4209.



63. *Peitsch M.C., Mannherz H.G., Tschopp J.*: The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends in Cell. Biol.* 1994, 4, 37–41.
64. *Peters J.M., Cattley R.C., Gonzales F.J.*: Role of PPAR $\alpha$  in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 1997, 18, 2029–2033.
65. *Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B.*: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997, 389: 300–305.
66. *Raff M.C.*: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992, 356, 397–400.
67. *Radziszewska E.*: Fizjologiczna rola apoptozy. *Post. Biol. Kom.* 1995, 22, 247–263.
68. *Reed J.C.*: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997, 387, 773–776.
69. *Roberts R.A., James N.H., Woodyatt N.J.*: Evidence for the suppression of apoptosis by peroxisome proliferator activated receptor (PPAR $\alpha$ ). *Carcinogenesis* 1998, 19, 43–48.
70. *Rolfe M., James N.H., Roberts R.A.*: Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) suppresses apoptosis and induces DNA synthesis in rodent hepatocytes: a mediator of the hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* 1997, 18, 2277–2280.
71. *Rożynkowska D.*: Genetyczne regulacje apoptozy, PCD. *Post. Biol. Kom.* 1994, 21, 303–318.
72. *Savill J., Dransfiels I., Hogg N., Haslett C.*: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990, 343, 170–173.
73. *Savill J., Fadok V., Henson P., Haslett C.*: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 1993, 14, 131–136.
74. *Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Oberhammer F., Wagner A., Jirtle R.*: Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. *Environ. Health Persp.* 1993, 101 (Suppl 5), 87–90.
75. *Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Mullauer L., Ruttkay-Nedecky B.*: Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mutation Res.* 1995, 333, 81–87.
76. *Schwartz L.M.*: The role of cell death genes during development. *Bio. Essays* 1991, 13, 389–395.
77. *Schwarz H., Buchmann A., Stinchcombe S., Luebeck G., Moolgavkar S., Bock K.W.*: Role of receptors in human and rodent hepatocarcinogenesis. *Mut. Res.* 1995, 69–76
78. *Siedlecki J.A.*: Molekularny scenariusz apoptozy. *Wiedza i życie* 1994, 11, 14–17.
79. *Siegel A., Kamiński M.*: Toksyczna śmierć komórki. *Acta Pol. Toxicol.* 1994, 2, 95–103.
80. *Sikora E.*: Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek. Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów. *Post. Bioch.* 1993, 39, 212–220.
81. *Sikora E.*: Przekazywanie sygnałów wywołujących śmierć komórki. W: *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, PWN 1995, 219–226.
82. *Stalder T., Hahn S., Erb P.*: Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 1994, 152, 1127–1133.
83. *Thompson E.B.*: Apoptosis and steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 1994, 665–673.
84. *Thompson C.B.*: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267, 1456–1462.
85. *Traczyk W.Z.*: Fizjologia człowieka w zarysie. PZWL, Warszawa 1992: 231–246.
86. *Trewes S., Trentini P.L., Ascanelli M., Bucci G., Di Virgilio F.*: Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* 1994, 211, 339–343.
87. *Walker N.I., Harmon B.V., Kerr J.F.R.*: Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 1988, 13, 18–25
88. *Wiślak P.*: Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego. *Post. Bioch.* 1997, 43, 85–90.
89. *Wyllie A.H.*: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980, 284, 555–556.

90. Zinkernagel R.M., Hengartner H.: T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implication for HIV and AIDS. *Immunol. Today* 1994, 15, 262–268.
91. Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X.: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997, 90, 405–413.

Otrzymano: 1998.07.10