

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

PROGRAMIRANA STANIČNA SMRT
PROGRAMMED CELL DEATH

Seminarski rad

Maja Šetinc

Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate study of molecular biology

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1	UVOD	2
2	MOLEKULARNI MEHANIZMI APOPTOZE	3
2.1	Aktivacija kaspaza	4
2.2	Intrinzični put apoptoze	5
2.3	Ekstrizični put apoptoze	6
3	REGULACIJA APOPTOZE.....	7
3.1	Regulacija apoptoze heat shock proteinima	8
3.2	Regulacija apoptoze reaktivim kisikovim radikalima	9
4	APOPTOZA U RAZVOJU.....	10
5	APOPTOZA TOKOM STARENJA	11
6	APOPTOZA U LIJEČENJU RAKA	12
7	LITERATURA	14
8	ZAKLJUČAK	15
9	SUMMARY	15

1 UVOD

Živi organizmi dinamični su sustavi koji se stalno mijenjaju, rastu i obnavljaju. Kako bi organizam ostao u ravnoteži, uz nastanak novih stanica potreban je i mehanizam uklanjanja starih, potencijalno opasnih stanica. Zato je stanična smrt jedan od najvažnijih procesa u višestaničnim organizmima. Broj stanica koje dnevno umiru u zdravom čovjeku iznenađujuće je velik i iznosi oko 10 milijuna (Chabaane i sur., 2013).

Stanična smrt proces je uključivanja signalnih puteva dizajniranih za pogubljenje stanice. Postoje tri morfološki različita tipa stanične smrti: apoptoza ili programirana stanična smrt, autofagija i nekroza. Svi oblici stanične smrti regulirani su signalnim putevima koji se uključuju kao odgovor na neku vrstu signala (Green i sur., 2015). Ti signalni putevi dijelom se mogu preklapati, dovodeći do povezanosti između različitih tipova stanične smrti (Chabaane i sur., 2013; Nikolettou i sur., 2013).

Apoptozu morfološki karakterizira odvajanje stanica od ostalih, zdravih stanica, kondenzacija kromatina, skupljanje stanica i pupanje membrana (poznato pod nazivom *blebbing*). Tim procesom nastaju apoptotska tjelešca koja se spajaju s makrofagima i tako razgrađuju stanicu bez aktivacije imunološkog odgovora (Chabaane i sur., 2013; Green i sur., 2015). Biokemijski gledano, apoptozu prati aktivacija skupine proteaza zvanih kaspaze, a signal za pokretanje kaskadne reakcije kaspaza može doći izvana ili iz same stanice (Green i sur., 2015; Kiraz i sur., 2016). Apoptoza je zaslužna za pravilan razvitak još u embrionalno doba, te igra izuzetno važnu ulogu kroz cijeli život organizma. Važan je obrambeni mehanizam u višestaničnim organizmima jer sprječava nakupljanje nefunkcionalnih stanica. Poremećaji u signalnom putu apoptoze mogu uzrokovati različite bolesti – od raka do neurodegenerativnih bolesti (Kiraz i sur., 2016). U ostatku seminara fokus će biti upravo na apoptozi, od mehanizama i regulacije do mogućih primjena u liječenju različitih bolesti.

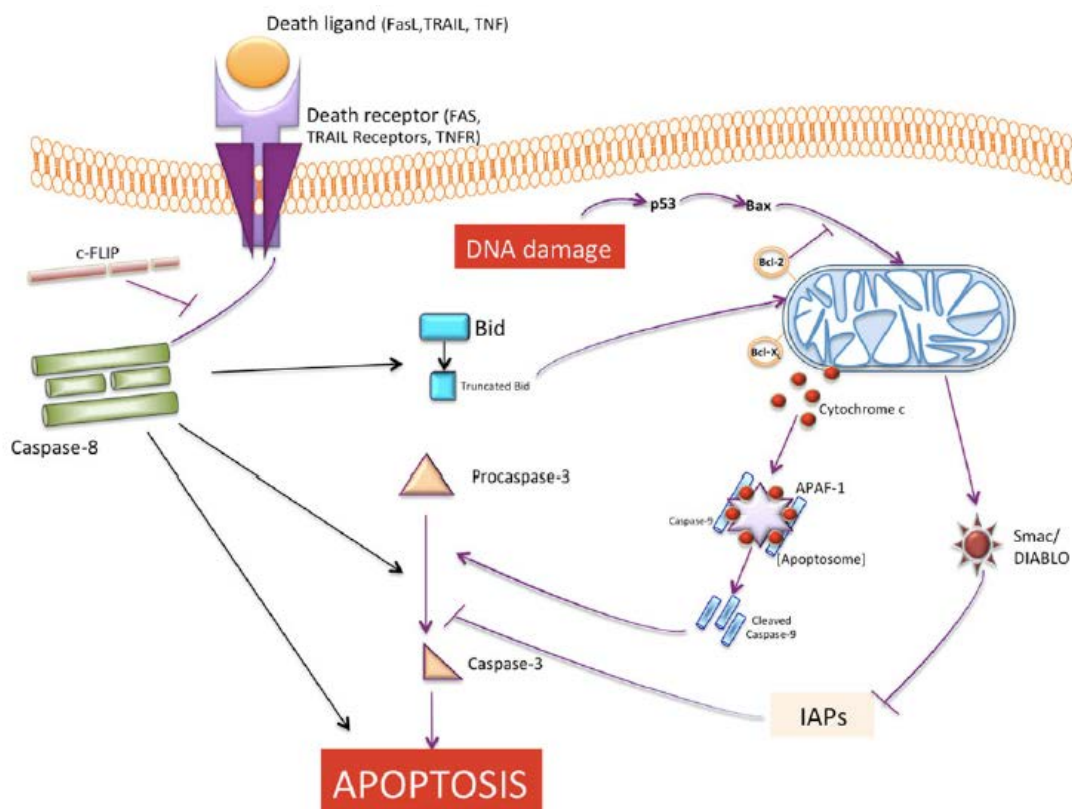
Autofagija je katabolički proces koji se javlja u uvjetima metaboličkog stresa poput gladovanja ili energetske kolapsa. Karakterizira je stvaranje autofagosoma – vezikula s dvostrukim membranama koje sadrže dio citoplazme ili organele, te njihova degradacija nakon spajanja s lizosomom. Autofagija je prvenstveno mehanizam preživljavanja, pokušaj prevladavanja letalnog stresa, no u nekim situacijama može potaknuti smrt stanice. Ključni događaji koji određuju hoće li autofagija biti korisna za stanicu ili će je ubiti još nisu poznati (Fulda i sur., 2010).

Nekroza je dugo smatrana slučajnim, neorganiziranim mehanizmom stanične smrti. Vjerovalo se da je uzrokuje isključivo veliko mehaničko oštećenje stanice, što dovodi do

pucanja stanične membrane i izlivanja citoplazme u međustanični prostor, te često do aktivacije imunološkog odgovora i upale. No, otkriveni su i signalni putevi koji mogu pokrenuti i regulirati proces nekroze, pogotovo u uvjetima u kojima je apoptoza inhibirana. To pokazuje da je nekroza mnogo uređeniji proces nego se prvotno mislilo (Fulda i sur., 2010; Green i sur., 2015).

2 MOLEKULARNI MEHANIZMI APOPTOZE

Saznanje o postojanju programirane stanične smrti nije novost u biologiji. Sam naziv i koncept ovog mehanizma potječe još iz 19. stoljeća. Od tada je znanje o apoptozi nadograđivano i prilagođavano novim znanstvenim spoznajama. Danas programiranom staničnom smrću smatramo kontrolirani proces biokemijskih i morfoloških promjena u stanici koji završava smrću stanice (Fulda i sur., 2010). Strogo je regulirana proapoptotskim i antiapoptotskim faktorima, a geni bitni za pravilno odvijanje apoptoze evolucijski su vrlo konzervirani od oblika sve do čovjeka (Arya i sur., 2015). Postoje dva puta aktivacije apoptoze – ekstrinzični i intrinzični. Oba puta uzrokuju kaskadnu reakciju kaspaza (Slika 1.).



Slika 1. Shema intrinzičnog i ekstrinzičnog puta apoptoze.

Oba procesa objašnjena su dalje u tekstu, u odlomcima 2.2 i 2.3. Preuzeto iz Kiraz i sur., 2016.

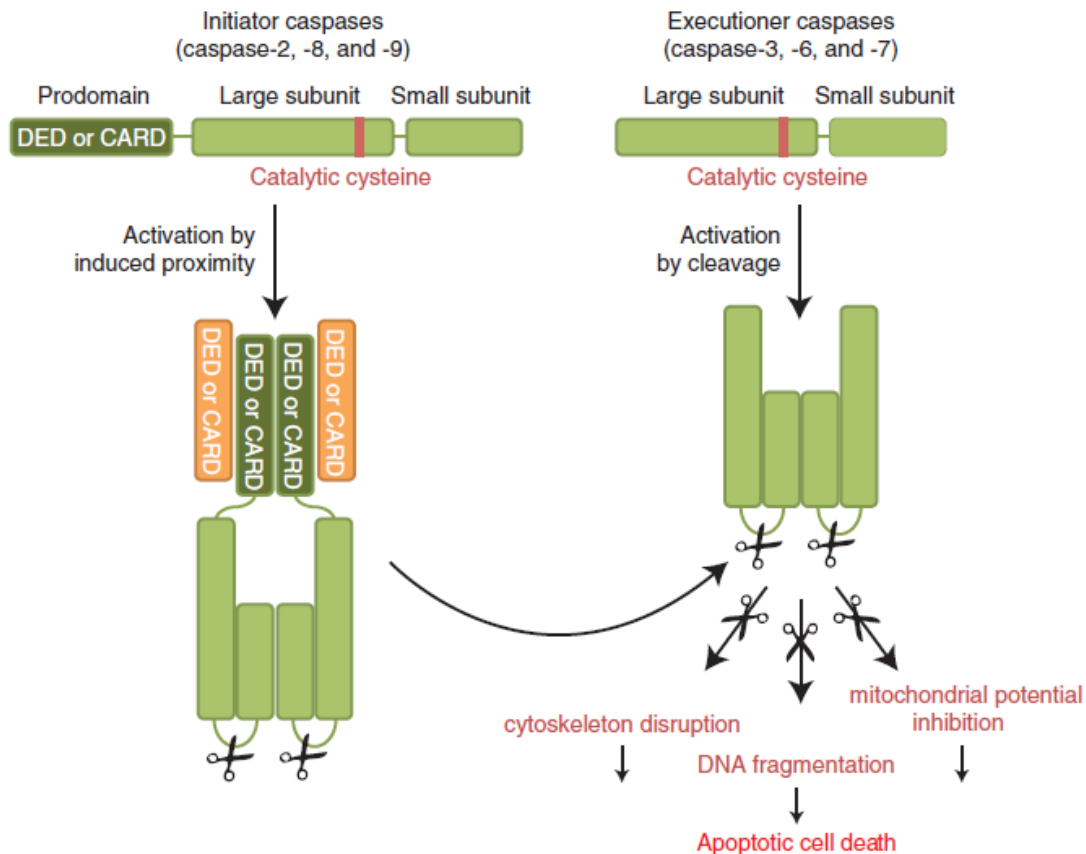
2.1 Aktivacija kaspaza

Kaspaze su obitelj proteaza koje u svom aktivnom mjestu sadrže cistein. Taj cistein nukleofilno napada i reže proteine na C-terminusu aspartata. Postoji ukupno 15 kaspaza; njih 7 sudjeluje u apoptozi, dok ostale imaju uloge u upalnim i ostalim procesima.

Apoptotske kaspaze su zaslužne za uništenje stanice u procesu programirane stanične smrti. Kaspaze-8 i -9 prve se aktiviraju u kaskadnoj reakciji kaspaza, ali u različitim signalnim putevima. One svojom aktivnošću aktiviraju ostale kaspaze. Kaspaze-3, -6 i -7 cijepaju stanične proteine i tako uzrokuju smrt stanice. Pokusi supresije gena za ove kaspaze pokazali su da glavnu ulogu ima kaspaza-3 – u slučaju njene supresije, apoptoza nije bila moguća. Supresija kaspaza-6 i -7 nije imala većeg utjecaja na apoptozu; pretpostavlja se da je kaspaza-3 preuzela svu aktivnost i tako nadomjestila nedostatak druge dvije kaspaze. Funkcije kaspaze-2 nisu još detaljno razjašnjene, ali utvrđena je njena uloga u apoptozi uzrokovanoj oštećenjem molekule DNA, nakupljanjem nesmotanih ili krivo smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu (pojava nazvana stresom endoplazmatskog retikuluma) i metaboličkim abnormalnostima. (Kiraz i sur., 2016). O kaspazi-10 još se ne zna mnogo, ali utvrđeno je da može preuzeti ulogu kaspaze-8 u inicijaciji kaspazne kaskade (Wang i sur., 2001). Apoptotske kaspaze se prema funkciji dijele na dvije skupine – inicijatorske i izvršne kaspaze (Slika 2.).

Inicijatorske kaspaze aktiviraju izvršne kaspaze, a u stanici postoje u obliku neaktivnih monomera. Adapterske molekule regrutiraju te monomere i dovode ih u bliski kontakt, uzrokujući konformacijsku promjenu i nastanak aktivnih mjesta. Kako bi adapterska molekula prepoznala kaspazu, obje molekule moraju imati specifičnu kaspaza-regrutirajuću domenu (*caspase – recruiting domain*, CARD) i tzv. domenu *death effector* (DED). Takve domene posreduju u protein – protein interakcijama, a karakterizira ih motiv od 6 amfipatskih α – zavojnica. Inicijatorske kaspaze su kaspaza-2, -8, -9 i -10. (Green i sur., 2015; Shalini i sur., 2015).

Izvršne kaspaze u stanici se sintetiziraju u obliku neaktivnih dimera kojima nedostaje domena za interakciju s proteinima. Aktiviraju ih inicijatorske kaspaze cijepanjem između budućih podjedinica enzima. Nakon cijepanja, podjedinice formiraju dimere i prolaze konformacijsku promjenu koja stvara aktivna mjesta. Zrele proteaze mogu prepoznati i cijepati i do 1000 različitih proteina. Izvršne kaspaze su kaspaza-3, -6 i -7 (Green i sur., 2015).



Slika 2. Shema aktivacije inicijatorskih i izvršnih kaspaza.

Preuzeto i prilagođeno iz Green i sur., 2015.

2.2 Intrinzični put apoptoze

Intrinzični ili mitohondrijski put apoptoze najčešći je mehanizam apoptoze u kralježnjaka. Aktivaciju ovog puta mogu uzrokovati toksične tvari, virusne infekcije, oštećenja molekule DNA, izlaganje zračenju ili gubitak različitih faktora rasta. (Green i sur., 2015; Kiraz i sur., 2016).

Prvi korak mitohondrijskog puta apoptoze reguliran je proteinima obitelji Bcl-2. To je velika skupina proteina koja ujedno sadrži i proapoptotske i antiapoptotske faktore, te faktore inicijatore apoptoze. U normalnim staničnim uvjetima proteini Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1 iz antiapoptotske grupe formiraju heterodimere s proteinima Bax i Bak iz proapoptotske skupine, blokirajući njihovo djelovanje. Tako se održava integritet membrane mitohondrija, i sprječava apoptoza. Kada je stanica ugrožena zbog oštećenja DNA, dolazi do ekspresije proteina s domenom BH3. To su proteini Bid, Bim, Bad, Noxa i Puma. Oni su inicijatori apoptoze, te vežu antiapoptotske faktore i tako oslobađaju proteine Bax i Bak. Kako bi se

dodatno potaknula apoptoza, antiapoptotski faktori, posebice Mcl-1, ubikvitiniraju se i zatim degradiraju. Sada neinhibirani proapoptotski faktori Bax i Bak tvore oligomere koji se umeću u vanjsku mitohondrijsku membranu te dovode do stvaranja pora i permeabilizacije. Svi topivi proteini iz intramembranskog prostora mitohondrija izljevaju se u citoplazmu (Xiong i sur., 2014; Green i sur., 2015).

Citokrom c iz mitohondrija curi u citoplazmu. Tu se veže na apoptotski proteaza – aktivirajući faktor 1, Apaf1. Inaktivni Apaf1 vezan je s ADP i dATP. Vezanje s citokromom C dovodi do zamjene ADP/dADP s ATP/dATP i aktivacije Apaf1. Kružni homoheptamerni kompleks aktiviranog Apaf1 i citokroma C naziva se apoptosom. Glavna uloga apoptosoma je vezanje i cijepanje inicijatorske prokaspaze-9, čime ona prelazi u aktivni oblik. Za pravilnu aktivnost kaspaze-9 nije toliko važno proteolitičko cijepanje, već vezanost za apoptosom. Holoenzim apoptosoma i kaspaze-9 je zaslužan za aktivaciju izvršnih kaspaza. (Xiong i sur., 2014; Green i sur., 2015). Kaspaza-3 zatim cijepa različite stanične proteine – kinaze, inhibitore endonukleaza, proteine citoskeleta, regulatorne proteine itd. Tada započinju morfološke promjene stanice tipične za apoptozu (Kiraz i sur., 2016).

Osim citokroma C, iz intramembranskog prostora mitohondrija oslobađaju se i proteini Smac (Diablo) i Omi (HtrA2). Oni pojačavaju aktivnost apoptosoma negativnom regulacijom X-vezanog inhibitora apoptoze (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*, XIAP). XIAP pripada skupini apoptotskih antagonista koji sadrže regiju za prepoznavanje i vezanje kaspaza. U uvjetima bez proteina Smac i Omi, XIAP veže kaspaze-9 -3 i -7, inhibirajući ih i potičući njihovu proteolitičku degradaciju. (Xiong i sur., 2014; Green i sur., 2015).

Endonukleaze G i AIF također se oslobađaju iz mitohondrija prilikom permeabilizacije mitohondrijske membrane, no imaju drugi cilj u stanici. Putuju i ulaze u jezgru stanice, gdje uzrokuju početnu kondenzaciju kromatina i fragmentaciju DNA. U kasnijim fazama apoptoze, uz pomoć kaspaze-3, kondenzacija i fragmentacija se još dodatno pojačavaju. (Kiraz i sur., 2016).

2.3 Ekstrinzični put apoptoze

Ekstrinzični put apoptoze ili put receptora smrti započinje na membranskim receptorima koji pripadaju skupini tumor – nekrotizirajućih faktora (TNF). Ti receptori sadrže domenu smrti (*death domain*, DD) sposobnu za povezivanje s domenama smrti adaptorskih molekula koje zatim aktiviraju kaspaze (Green i sur., 2015, Kiraz i sur., 2016).

Signalna molekula za početak ekstrinzičnog puta dolazi iz izvanstaničnog prostora. Različite molekule vežu se na svoje specifične receptore smrti i tvore komplekse ligand – receptor. Neki od njih su Fas ligand/ FasR, TNF/TNF R1 i TNF-srodan inducirajući apoptotski ligand, TRAIL/TRAIL R1. Vežanje liganda potiče primicanje receptora u membrani te prepoznavanje i vežanje adapterskih molekula – Fas-vezanih domena smrti, FADD. Veze između receptora i adaptera ostvaruju se preko domena smrti. Adapterske molekule vežu monomere inicijatorske prokaspaze-8, što potiče njihovu konformacijsku promjenu i aktivaciju. Adapter i vezana kaspaza-8 tvore *death inducing signaling complex*, DISC (Green i sur., 2015; Fulda i sur., 2010). Aktivirana kaspaza-8 odvaja se s DISC-a autokatalitičkom aktivnošću i pokreće daljnju kaskadu kaspaza, tako inicirajući apoptozu. Također, kaspaza-8 može pokrenuti i intrinzični put apoptoze aktivirajući inicijator apoptoze Bid, ili aktivirajući izvršne kaspaze-3 i -7 (Green i sur., 2015, Kiraz i sur., 2016). Tako se vanjskim signalom uključuju oba puta apoptoze s istim finalnim rezultatom – smrću stanice.

Signalni put pokrenut vežanjem liganda za TNFR1 je nešto kompleksniji i može dovesti do tri različita ishoda: preživljavanja, apoptoze i nekroze. Adapterska molekula koja se veže na TNFR1 je TRADD, TNFR-vezana domena smrti. Ona ne aktivira kaspazu-8 direktno poput FADD, već služi kao skela za regrutiranje drugih signalnih molekula. Ako se za TRADD veže kinaza RIP1 i ubikvitin ligaze TRAF2 i cIAP1/2 (koje ubikvitiniraju RIP1), dolazi do aktivacije NF- κ B signalnog puta i upalnog procesa, a ne do stanične smrti. Ako ne dođe do ubikvitinacije RIP1, RIP1 i TRADD uklanjaju se s TNFR1, a stanica može ući ili u apoptozu ili u nekrozu. Ako se na TRADD veže FADD, doći će do aktivacije kaspaze-8 i apoptoze, a ako se na RIP1 veže kinaza RIP3, doći će do nekroze (Green i sur., 2015).

Ekstrinzični put apoptoze može biti blokiran proteinom FLIP. On posjeduje *death effector* domenu sličnu onoj kaspaze-8 te se zato može vezati na FADD i tvoriti heterodimere s kaspazom-8. No, FLIP nema katalitičkog cisteina, pa ne dolazi do kaskade kaspaza i apoptoze. Do ekspresije proteina FLIP dolazi kada je aktivan signalni put NF- κ B (Green i sur., 2015, Kiraz i sur., 2016).

3 REGULACIJA APOPTOZE

Apoptoza je kompleksni proces kojeg prati i kompleksni sustav regulacije. Komponente apoptotskog signalnog puta prolaze kroz niz posttranslacijskih modifikacija – od fosforilacije i ubikvitinacije do proteolitičkih cijepanja. Mnogo tih modifikacija uvjetovano je reaktivnim kisikovim radikalima. Iako su kisikovi radikali prisutni u svim stanicama, pogotovo u

mitohondrijima, njihova količina značajno raste u stresnim uvjetima koji promoviraju apoptozu (Wu i sur., 2013). Apoptotski proteini često stupaju u interakcije s molekularnim šaperonima, *heat shock* proteinima (HSP), koji povećavaju otpornost stanice na različite vrste stresa. Indukcija ekspresije HSP potiče termotoleranciju i povezana je s porastom otpornosti na staničnu smrt. HSP tako predstavljaju obrambeni mehanizam koji stanici daje šansu da preživi stresne uvjete. No, pri prevelikom oštećenju stanice ne dolazi do aktivacije *heat shock* odgovora, i stanica normalno ulazi u apoptozu. To je primjer osjetljive regulacije koja uzima u obzir trenutno stanje stanice, a rezultira s ishodom koji je najpovoljniji za cijeli organizam (Kennedy i sur., 2014; Fulda i sur., 2010).

3.1 Regulacija apoptoze *heat shock* proteinima

Heat shock proteini evolucijski su konzervirana skupina proteina s važnom ulogom u preživljavanju stanice. U normalnim uvjetima eksprimirani su na bazalnoj razini, a njihova količina u stanici raste u stresnim uvjetima – pri povišenoj temperaturi, u prisutnosti teških metala ili kod oksidacijskog stresa (Fulda i sur., 2010). Skupina HSP najpoznatija je grupa šaperona, proteina koji sprječavaju agregaciju i ispravljaju krivo smotane proteine. To rade pomažući u ispravnom smatanju proteina, sastavljanju kompleksa, ubikvitinaciji, transportu i degradaciji proteina. No, novija istraživanja pokazuju da to nije njihova jedina uloga, već HSP imaju važnu ulogu u održavanju citoskeletnog integriteta, a dolazi i do direktne interakcije između HSP i proteina apoptotskih puteva. HSP mogu regulirati apoptozu na nekoliko razina (Kennedy i sur., 2014).

Skupina HSPA1, poznatija kao HSP70, utječe na intrinzični put apoptoze na tri specifična mjesta u signalnom putu. HSPA1 inhibiraju degradaciju antiapoptotskog faktora Mcl-1 i sprječavaju djelovanje proapoptotskog faktora Bax, vjerojatno otežavajući njegov transport do membrane mitohondrija. Otežavaju otpuštanje citokroma c iz mitohondrija, čime reguliraju apoptozu na razini permeabilizacije mitohondrija. HSPA1 vežu se i na prokaspaze-3 i -7, sprječavajući njihovu aktivaciju. Osim intrinzičnog puta apoptoze, HSPA1 mogu regulirati i ekstrinzični put – vežu se na receptore TRAIL, TRAIL R1, i tako blokiraju formaciju DISC-a i daljnju apoptozu. HSPA1 inhibiraju i stresne kinaze ASK1, JNK i p38 koje reguliraju aktivnost proteina iz obitelji Bcl-2; tako se sprječava apoptoza na razini iznad intrinzičnog puta apoptoze.

Skupina HSPB1 ili mali HSP reguliraju intrinzični put apoptoze aktivirajući kinazu AKT koja sprječava aktivaciju Bax i inaktivira inicijator apoptoze Bad fosforilacijom.

Također, HSPB1 smanjuju aktivnost kinaza JNK i tako promoviraju preživljavanje stanice. Slično kao i HSPA1, HSPB1 otežava izlazak citokroma c iz mitohondrija i smanjuje uspješnost formiranja apoptosoma. HSPB1 indirektno reduciraju aktivnost intrinzičnog puta stabilizirajući aktinski citoskelet i održavajući veze među stanicama. HSPB5, jedan od malih HSP, može se direktno vezati na Bax i Bcl-x, sprječavajući njihov transport u mitohondrij. Također, inhibira aktivaciju prokaspaze-3.

HSPC1 ili HSP90, slično kao HSPB1 aktiviraju AKT kinazu sprječavajući apoptozu. Vežu i stabiliziraju survivin, člana skupine proteina inhibitora apoptoze (IAP). No, ovisno o uvjetima, mogu imati i proapoptotsko djelovanje.

HSPD1 i HSPE1 mogu regulirati apoptozu i pozitivno i negativno. Vežanje ovih šaperona za prokaspazu-3 potiče njenu aktivaciju, a prekomjerna ekspresija ovih proteina sprječava otpuštanje citokroma c i smanjuje kaspaznu aktivnost (Kennedy i sur., 2014).

Permeabilizacija vanjske membrane mitohondrija uzrokuje energetske kolaps stanice, te u većini slučajeva dovodi do stanične smrti. No, u određenim uvjetima stanica ipak može preživjeti. HSP70 jedan je od proteina u proteinskom kompleksu zaduženom za izmjenu hidroliziranog dADP s dATP prilikom formacije apoptosoma. Ako ovaj mehanizam nukleotidne izmjene zakaže, dolazi do agregacije i ireverzibilne inaktivacije Apaf1, čime je daljnja apoptoza blokirana. Ako se takva stanica uspije oporaviti od energetske kolapsa, preživjeti će (Green i sur., 2015).

3.2 Regulacija apoptoze reaktivnim kisikovim radikalima

U organizmu postoji ravnoteža između reaktivnih kisikovih radikala, jakih oksidansa, i antioksidacijskog mehanizma obrane. Kisikovi radikali potječu iz same stanice, kao nusprodukti mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona. To su najčešće superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), peroksilni radikal (HO_2^{\bullet}), slobodni kisik i dušikov oksid (NO^{\bullet}). U organizmu ih razgrađuju enzimi poput katalaze, glutation peroksidaze i superoksid dismutaze uz pomoć antioksidansa poput glutationa. Ako se ravnoteža naruši i koncentracija kisikovih radikala poraste, nastale uvjete nazivamo oksidacijskim stresom (Fulda i sur., 2010).

Kisikovi radikali mogu potaknuti apoptozu na različite načine. Aminokiseline u citokromu c mogu se modificirati pod utjecajem kisikovih radikala, no nije postignut konsensus o utjecaju takvih modifikacija na formiranje apoptosoma (Wu i sur., 2013). H_2O_2 potiče otpuštanje citokroma c i aktivira transkripcijske faktore koji potiču apoptozu. NO^{\bullet}

inaktivira antioksidacijske enzime i potiče oba puta apoptoze – intrinzični povećanjem permeabilnosti membrane mitohondrija, a ekstrinzični poticanjem vezanja liganda Fas na receptor Fas (Fulda i sur., 2010). Istraživanja utjecaja kisikovih radikala na formaciju apoptosoma i aktivaciju kaspaze-9 dala su suprotne rezultate. Rezultat jednog tvrdi da se apoptosom nije mogao formirati u prisutnosti antioksidansa jer je oksidacija Apaf1 bila nužna za aktivaciju kaspaze-9, dok je u drugom istraživanju utvrđeno da kisikovi radikali inhibiraju aktivaciju kaspaze-9 preko oksidacije cisteinskih aminokiselinskih ostataka. Treće istraživanje utvrdilo je indirektnu inhibiciju apoptoze kisikovim radikalima zbog aktivacije određenih regulatornih kinaza, npr. JNK. Kako bi se utvrdio točan utjecaj kisikovih radikala na Apaf1, kaspazu-9 i formaciju apoptosoma, potrebno je provesti još istraživanja o toj temi. Negativna regulacija aktivnosti kaspaze-3 kisikovim radikalima pokazana je u više istraživanja, jer dolazi do modifikacija cisteinskih ostataka, uključujući one katalitičke. (Wu i sur., 2013).

4 APOPTOZA U RAZVOJU

Apoptoza igra ključnu ulogu u pravilnom razvoju višestaničnih životinja. To je idealni tip stanične smrti za reorganizaciju tkiva – dolazi do uništenja neželjenih stanica bez nanošenja štete ostalim stanicama. U nekim slučajevima dolazi samo do smrti određenih stanica, dok se u drugim eliminiraju čitava tkiva. Neki od primjera apoptoze tokom razvoja su degradacija vezivnog tkiva između prstiju u viših kralježnjaka, regresija umbilikalnih arterija nakon rođenja u placentalnih sisavaca, eliminacija repa u punoglavaca i degeneracija pronefrosa u vodozemaca i sisavaca (Pérez-Garijo i sur., 2015; Arya i sur., 2015).

No, u većine organizama najveći udio stanične smrti se tokom razvoja događa u živčanom sustavu. U vinskoj mušici, živčani sustav se mijenja prilikom transformacije puzajuće larve u odraslu, leteću mušicu. Apoptozom se uklanjaju i roditeljske stanice neurona koje se dijele, i višak neurona u trbušnom dijelu živčane vrpce (Arya i sur., 2015). U kralježnjaka razvoj živčanog sustava započinje formacijom neuralne ploče, koja se zatvara i tvori neuralnu cijev, preteču mozga i leđne moždine. Primijećen je veliki udio stanica u apoptozi u samom procesu zatvaranja neuralne cijevi (Pérez-Garijo i sur., 2015). Prilikom formiranja mozga u kasnijim fazama razvoja nastaje mnogo veći broj neurona nego što ih ima u potpuno razvijenom tkivu. Pretpostavlja se da u sisavaca oko 50% neurona tokom razvoja umire apoptozom. Funkcija takve nadprodukcije stanica i eliminacija viška olakšava proces ispravnog spajanja neurona i uspostavljanja funkcionalnih moždanih veza (Arya i sur., 2015).

Proučavanjem programirane stanične prilikom zatvaranja neuralne cijevi otkriven je utjecaj apoptoze na okolno tkivo. Izvor tog signala nisu bile umiruće stanice, već one predodređene za ulazak u apoptozu. Kada je neuralna cijev zatvorena, sve stanice koje su ekspimirale određeni faktor Fgf naglo ulaze u apoptozu, i tada nestaje učinak na okolne stanice. Takvi rezultati navode na pretpostavku da možda glavna uloga apoptoze u razvitku središnjeg živčanog sustava nije kontrola broja stanica, već regulacija morfogeneze gradacijom kemijskih signala i modulacijom napetosti u okolnim tkivima.

Osim uloge u reorganizaciji tkiva, neki tipovi stanica u apoptozi proizvode mitotske signale koji potiču proliferaciju okolnog tkiva. Tako može uvelike pridonijeti i sposobnosti regeneracije nekog organizma. U drugim se tipovima stanica događa upravo suprotno – apoptotske stanice mogu čak i poticati okolne stanice na apoptozu, pa govorimo o apoptoza – induciranoj apoptozi. Također, apoptoza igra i ulogu u fuziji stanica. Apoptotske stanice reguliraju fuziju nediferenciranih mioblasta, prekursora mišićnih stanica, u funkcionalne miofibrile (Pérez-Garijo i sur., 2015).

Prilikom istraživanja apoptoze u živčanom sustavu pronađene su dvije vrste apoptotskih stanica. Jedna vrsta su normalne, očekivane apoptotske stanice s tipičnim apoptotskim značajkama, dok je druga vrsta stanica pokazivala znakove kaspazne aktivnosti, ali je zadržavala okrugli oblik, nije fragmentirala, aktivno se kretala u tkivu i preživljavala kroz dulji period. Te neočekivane stanice nazvane su plešućim apoptotskim stanicama. Za sada je njihova uloga nepoznata, ali pretpostavlja se da bi mogle proizvoditi drugačije signalne molekule i tako uzrokovati drugačije učinke na okolna tkiva (Pérez-Garijo i sur., 2015).

5 APOPTOZA TOKOM STARENJA

U odraslom organizmu uspostavlja se dinamička ravnoteža između diobe stanica i programirane stanične smrti, pogotovo u tkivima koja se stalno obnavljaju – epidermi kože, epitelu crijeva i pluća, krvi, bubrezima. Sa starenjem organizma dolazi do grešaka u regulaciji procesa programirane stanične smrti, pa je apoptoza manje ili više aktivna od optimalnog.

Smanjenje apoptotske aktivnosti uzrokovano starenjem posljedica je smanjene ekspresije apoptotskih gena. Događa se u mnogim stanicama – matičnim adipoznim stanicama, matičnim stanicama koštane srži, limfocitima, stanicama glatkih mišića žila i hepatocitima. Razlog opadanja apoptotske aktivnosti moglo bi biti usporavanje obrtaja stanica

u adultnim tkivima – nastaje manje novih stanica i manje starih stanica umire. Takav smanjeni obrtaj stanica uzrokovan je greškama u radu mitohondrija i usporavanjem metaboličkih procesa tokom starenja.

Povećanje apoptotske aktivnosti dovodi do smanjenja broja bijelih krvnih stanica u timusu i koštanoj srži, posebno T-limfocita. Smanjuje se i broj miocita u srcu, a dolazi i do hipertrofije preostalih miocita, što su znakovi starenja srčanog mišića. Također, skeletna mišićna vlakna, stanice bubrega, slušne dlačice i melanocitne matične stanice sve pokazuju povećanu podložnost apoptozi. Apoptoza ima važnu ulogu u zacjeljivanju rana, pa se proces zarastanja ozljeda usporava kako organizam stari. U normalnom živčanom sustavu adultne jedinke neuroni ne bi smjeli umirati apoptozom; ako se to ipak događa, dolazi do pojave neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti. Do povećane apoptotske aktivnosti dovode oksidativni stres, oštećenja mitohondrija i mitohondrijske DNA te nakupljene greške u genomu starih stanica, uz neke promjene u signalnim putevima koje čine stanice sklonijima upalama i podložnijima stresu (Tower, 2015).

6 APOPTOZA U LIJEČENJU RAKA

Jedno od jedinstvenih svojstava stanica raka je njihova sposobnost da izbjegnu mehanizme programirane stanične smrti. Stanice koje se otmu kontroli i ne uđu u apoptozu kada bi trebale mogu se početi nekontrolirano dijeliti i uzrokovati nastanak tumora. Pravovremena apoptoza inhibira onkogenezu na više razina – od transformacije stanica do nastanka metastaza (Bates i sur., 2013; Lopez i sur., 2015).

Gen *p53* mutiran je u mnogim oblicima raka (Tower, 2015; Kiraz i sur., 2016). Produkt tog gena, protein *p53*, smatra se čuvarom genoma. To je tumor- supresorski transkripcijski faktor čije se izoforme nalaze u mnogim organizmima. Kontrolira ekspresiju velikog seta gena uključenih u detekciju oštećenja i popravka DNA, zastoja u staničnom ciklusu i apoptozi. U normalnim stanicama, količina *p53* vrlo je mala jer je *p53* lako degradira. No, kada dođe do oštećenja stanice, *p53* se stabilizira i njegova koncentracija u stanici raste, što dovodi do aktivacije apoptotskih mehanizama. *p53* sudjeluje u aktivaciji intrinzičnog puta apoptoze induciranjem transkripcije proapoptotskih gena obitelji *Bcl-2*, ali i svojom translokacijom u mitohondrij, gdje se veže na antiapoptotske faktore *Bcl-x* i *Bcl-2* potičući permeabilizaciju mitohondrijske membrane (Chaabane i sur., 2012; Kiraz i sur., 2016). Potiče i aktivaciju ekstrinzičnog puta apoptoze indukcijom transkripcije gena za receptore smrti.

Najčešće mutacije p53 su pogrešne, *missence* mutacije u DNA – veznoj domeni, čime je onemogućeno vezanje p53 na ciljna mjesta u genomu i aktivacija tih gena. Takvi mutanti p53 gube tumor-supresorsku aktivnost jer ne dolazi do apoptoze, već do potencijalne transformacije stanica i posljedično do onkogeneze (Kiraz i sur., 2016).

Najbolji način tretiranja raka je ubijanje tumorskih stanica. Mnogi kemoterapeutici djeluju upravo tako da izazivaju apoptozu. Većina podrazumijeva ciljanje i uključivanje elemenata intrinzičnog puta apoptoze. Ciljno se tretiraju geni obitelji Bcl-2 – povećava se količina proapoptotskih, a smanjuje količina antiapoptotskih faktora. Koriste se i molekule koje strukturno slične na inicijatore apoptoze iz obitelji BH3-only te se zato mogu vezati s antiapoptotskim faktorima i blokirati ih (Bates i sur. 2013; Lopez i sur., 2015). Kemoterapeutici mogu biti i agonisti receptora smrti. Takve molekule djeluju izvan stanice i direktno aktiviraju ekstrinzični put apoptoze vezanjem na receptore smrti. Konačno, apoptoza se može inducirati i blokatorima proteina inhibitora apoptoze, čime se inaktivira njihovo djelovanje (Bates i sur., 2013).

7 LITERATURA

- Arya R., White K.: **Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms**; *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2015) 39, 12 – 19
- Bates D. J. P., Lewis L. D.: **Manipulating the apoptotic pathway: potential therapeutics for cancer patients**; *British Journal of Clinical Pharmacology* (2013) 76: 3, 381 – 395
- Chaabane W., User S. D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Los M. J.: **Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer**; *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* (2013) 61, 43 – 58
- Fulda S., Gorman A. M., Hori O., Samali A.: **Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death**; *International Journal of Cell Biology* (2010) 2010
- Green D. R., Llamby F.: **Cell Death Signaling**; Cold Spring Harbor Laboratory Press (2015) 7
- Kennedy D., Jäger R., Mosser D. D., Samali A.: **Regulation of Apoptosis by Heat Shock Proteins**; *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (2014) 66: 5, 327 – 338
- Kiraz Y., Adan A., Yandim M. K., Baran Y.: **Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis**; *International Society of Oncology and BioMarkers* (2016)
- Lopez J., Tait S. W. G.: **Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within**; *British Journal of Cancer* (2015) 112, 957–962
- Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N.: **Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy**; *Biochimica et Biophysica Acta* (2013) 1833, 3448–3459
- Pérez-Garijo A., Steller H.: **Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease**; *The Company of Biologists Ltd, Development* (2015) 142, 3253-3262
- Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S.: **Old, new and emerging functions of caspases**; *Cell Death and Differentiation* (2015) 22, 526–539
- Tower J.: **Programmed cell death in ageing**; *Ageing Research Reviews* (2015)
- Wang J., Chun H. J., Wong W., Spencer D. M., Lenardo M. J.: **Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling**; *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2001) 98:24, 13884–13888
- Wu C., Bratton S. B.: **Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species**; *Antioxidants & Redox Signaling* (2013) 19:6
- Xiong S., Mu T., Wang G., Jiang X.: **Mitochondria-mediated apoptosis in mammals**; *Protein Cell* (2014) 5:10, 737–749

8 ZAKLJUČAK

Cilj ovog seminara upoznavanje je s osnovnim mehanizmima apoptoze i glavnim ulogama programirane stanične smrti u višestaničnim organizmima.

Apoptoza je programirani proces stanične smrti praćen aktivacijom kaspaza, cisteinskih aspartat – specifičnih proteaza. Postoje dva puta apoptoze – intrinzični i ekstrinzični. Intrinzični put započinje permeabilizacijom vanjske membrane mitohondrija, a ekstrinzični vezanjem signalnih molekula na receptore smrti u staničnoj membrani. Apoptoza ima veliku ulogu u pravilnom razvoju organizama. Osim održavanja ravnoteže između novonastalih i umirućih stanica, jedan je od glavnih pokretača morfogeneze i reorganizacije tkiva. Pojačana ili smanjena apoptoza nekih stanica jedan su od uzroka starenja. Programirana stanična smrt kompleksni je proces koji se može regulirati na mnogo razina, a greške u regulaciji dovode do pojave bolesti. Usmjereni ciljanje mehanizama apoptoze moglo bi biti ključ za liječenje raka, što čini istraživanja na ovu temu vrlo značajnima.

9 SUMMARY

The goal of this review is to introduce the reader with basic mechanisms of apoptosis and the main functions of programmed cell death in multicellular organisms.

Apoptosis is a programmed process of cell death accompanied by activation of caspases, cysteinyl aspartate – specific proteases. There are two main pathways of apoptosis – intrinsic and extrinsic. Intrinsic pathway begins with permeabilization of outer mitochondrial membrane, while extrinsic pathway begins with binding of signal molecules to death receptors in cell membrane. Apoptosis plays a great role in correct development of organisms. Apart from its role in keeping the balance between newly-formed and dying cells, it is also one of the main initiators of morphogenesis and tissue reorganization. Upregulated or downregulated apoptosis of some cells is one of the main causes of ageing. Programmed cell death is a complex process that can be regulated on many levels, and misregulation of that process can often lead to an occurrence of illnesses. Direct targeting of apoptotic mechanisms could hold the key to curing cancer, which makes researches of this topic very significant.