

**Agnieszka Pedrycz, Piotr Siermontowski, Grzegorz Lonc,
Małgorzata Tomasiak**

dr hab. med. Agnieszka Pedrycz
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
z Pracownią Cytologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.
ul. Radziwiłłowska 11 20-080, Lublin
e-mail: apw4@wp.pl

dr med. Piotr Siermontowski
Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej
Wojskowy Instytut Medyczny
ul. Grudzińskiego 4 81-103 Gdynia 3 skr. poczt. 18
tel./fax. 58/6264109 tel./fax. MON 264109,
e-mail: nurdok@tlen.pl

dr wet. Grzegorz Lonc
Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

Małgorzata Tomasiak
Uniwersytet Medyczny w Lublinie.
al. Raławickie 1, 20-080, Lublin

**ZEWNĘTRZNA DROGA INDUKCJI SYGNAŁU DO APOPTOZY -
RECEPTORY ŚMIERCI**

Apoptoza jest to ściśle regulowany, naturalny proces zaprogramowanej śmierci komórek w organizmie wielokomórkowym. Dzięki niemu z organizmu usuwane są zużyte lub uszkodzone komórki. Istnieją dwa podstawowe tory indukcji sygnału do apoptozy zewnętrzny i wewnętrzny. Droga zewnętrzna, której poświęcona jest niniejsza praca - jest to szlak indukowany przez czynniki zewnętrzne pobudzające błonowe receptory, posiadające wewnątrzkomórkową domenę zwaną domeną śmierci (death domain) lub też atakiem limfocytów T cytotoksycznych. Możliwe jest też zainicjowanie apoptozy przez połączenie białek błonowych Fas i FasL w obrębie tej samej komórki

W pracy przeanalizowano cechy charakterystyczne niektórych receptorów błonowych, zwanych receptorami śmierci, pobudzanych w przebiegu zewnętrznego toru indukcji sygnału do apoptozy. Receptory, które wzięto pod uwagę to: TNFR-1, CD95/TRAIL-R1, TRAIL-R2, NGFR.

Słowa kluczowe: receptory śmierci, apoptoza.

Apoptoza (z greckiego *apoptosis* - w tłumaczeniu dosłownym opadanie liści) jest to ściśle regulowany, naturalny proces zaprogramowanej śmierci komórek w organizmie wielokomórkowym. Dzięki niemu z organizmu usuwane są zużyte lub uszkodzone komórki.

Metaforyczny termin apoptoza został wprowadzony w 1972 r. przez Kerr'a i współpracowników, którzy odróżnili wówczas martwicę (*necrosis*) od apoptozy podkreślając, że w obu tych zjawiskach zachodzą różne procesy biochemiczne i morfologiczne. Zamiennie stosowali oni termin „programowana śmierć komórki”. Później jednak część autorów postulowała używanie terminu „programowanej śmierci komórki” w odniesieniu do fizjologicznej śmierci komórek w procesie rozwoju, zaś w odniesieniu do śmierci komórek pod wpływem czynników zewnętrznych terminu apoptoza.

Najczęściej obecnie wyróżnianymi przez autorów typami śmierci komórki są (Lockshin 2004): TYP I apoptoza, TYP II autofagia, TYP III nekroza

Odzwierciedleniem rosnącego zainteresowania badaniami nad apoptozą było przyznanie Nagrody Nobla z fizjologii lub medycyny w roku 2002. Otrzymali ją Sydney Brenner, H. Robert Horvitz i John E Sulston za ich odkrycia z dziedziny genetycznej regulacji organogenezy i zaprogramowanej śmierci komórki.

Istnieją dwa podstawowe tory indukcji sygnału do apoptozy (Bielak-Żmijewska 2003). Droga zewnętrzna - jest to szlak indukowany przez czynniki zewnętrzne pobudzające błonowe receptory, posiadające wewnątrzkomórkową domenę zwaną domeną śmierci (death domain) lub też atakiem limfocytów T cytotoksycznych. Możliwe jest też zainicjowanie apoptozy przez połączenie białek błonowych Fas i FasL w obrębie tej samej komórki (Pedrycz-Wieczorska 2006). Droga wewnętrzna, która może przebiegać z udziałem mitochondriów (droga wewnętrzna mitochondrialna) lub z udziałem siateczki śródplazmatycznej (droga wewnętrzna retikularna).

Apoptoza jest śmiercią zaprogramowaną, kontrolowaną. Jest mechanizmem fizjologicznym służącym do eliminowania pojedynczych uszkodzonych i starych komórek, bez naruszania integralności tkanek i powstawania odczynu zapalnego. Komórka ulegająca apoptozie kurczy się, jej organella zachowują pełną integralność, DNA pocięte przez endonukleazy tworzy charakterystyczną, uporządkowaną drabinę apoptotyczną widoczną podczas elektroforezy DNA na żelu agarozowym. Fragmenty pociętego DNA mają wielkość odpowiadającą odcinkom między sąsiadującymi nukleosomami. Tworzące się ciała apoptotyczne są fagocytowane przez sąsiednie komórki.

Apoptoza odgrywa ważną rolę przez całe życie organizmów. W embriogenezie warunkuje prawidłowy rozwój tkanek i narządów (zanikanie błony pławnej między palcami człowieka, eliminacja limfocytów T rozpoznających własne antygeny). Apoptoza w życiu płodowym sprawuje również kontrolę nad rozwojem m. in. łożyska. Nieodpowiednio nasiloną apoptozą trofoblastu może spowodować patologię ciąży taką jak np. stan przedrzucawkowy (Dash 2003). Podczas życia osobniczego bierze udział w stałym podtrzymywaniu czynności organizmu (utrzymanie stałej liczby komórek w poszczególnych narządach, usuwanie niebezpiecznych komórek tzn. zakażonych wirusami, posiadających uszkodzone DNA, nowotworowych) oraz w procesie starzenia się tkanek.

Proces apoptozy został umownie podzielony na 3 fazy: Fazę decydującą, fazę wykonawczą i fazę degradacji (Chmielewski 2003).

Faza decydująca apoptozy jest odwracalna, liczona od chwili wygenerowania sygnału do apoptozy do uruchomienia kaskady kaspaz. Sygnał może uruchomić bezpośrednio uszkodzenie DNA pod wpływem różnych czynników stresogennych. Może uruchomić również pobudzenie niektórych receptorów błonowych - sygnały zewnętrzne.

Apoptosis (from Greek apoptosis – the literal translation: leaves falling) is a strictly regulated, natural process of programmed cell death in multi-cellular organisms. Via this process, worn-out or damaged cells are removed from the body.

The metaphorical term, apoptosis, was introduced in 1972 by Kerr and colleagues, who then divided necrosis from apoptosis, highlighting that in both these phenomena different biochemical and morphological processes occur. Alternatively, they used the term "programmed cell death." Later, however, some authors proposed the use of the term "programmed cell death" in relation to physiological cell death in the developmental process and in relation to cell death under the influence of external factors the term "apoptosis"

Nowadays, most authors distinguish three types of cell death (Lockshin et al 2004): Type I apoptosis, TYPE II autophagy, TYPE III necrosis.

Reflecting the growing interest on apoptosis in research, the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2002 was given to Sydney Brenner, H. Robert Horvitz and John E. Sulston for their discoveries in the field of genetic regulation of organogenesis and programmed cell death.

There are two basic paths of inducing apoptosis (Bielak-Zmijewska 2003). The external path and the internal path. The external path is induced by external factors stimulating membrane receptors which have the intracellular domain called death domain or cytotoxic lymphocyte T attack. It is also possible to initiate apoptosis by combining two membrane proteins Fas and FasL within the same cell (Pedrycz-Wieczorska 2006). The internal path, takes place with the participation of mitochondria (mitochondrial internal path) or with the participation of endoplasmic reticulum (reticular internal path).

Apoptosis is the programmed, controlled death of cells. A physiological mechanism is used to eliminate single, damaged and old cells without affecting the integrity of tissues and the formation of inflammation. Cells which are liable to apoptosis shrink, whilst their organelles retain full integrity and their DNA, that is cut by the endonuclease, creates a distinctive nit apoptotic ladder that is visible during DNA electrophoresis on the agarose gel. Cleaved DNA fragments have a size corresponding to the segments between adjacent nucleosomes. Apoptotic corpuscles that are formed are phagocytosed by adjacent cells.

Apoptosis plays an important role during the whole life of organisms. In embryogenesis it determines the correct development of tissues and organs (the disappearance of the webs between human fingers, the elimination of T cells that recognise their own antigens). Apoptosis during foetal life takes part in controlling the development of e.g. placenta. Inappropriately severe trophoblast apoptosis may lead to the pregnancy pathology such as preeclampsia (Dash 2003). During the interindividual life it is involved in maintaining constant body functions (a constant number of cells in various organs, the removal of dangerous cancerous cells that are infected with viruses that cause damage to the DNA) and in the tissues' aging process.

The process of apoptosis is conventionally divided into three phases: decisive phase, implementation phase and degradation phase (Chmielewski 2003).

The decisive phase of apoptosis is reversible, it starts with generating a signal and lasts until the beginning of caspase cascade. The signal can directly start the damage of DNA under the influence of different stressors. It can also activate the stimulation of membrane receptors - the output signals.

Jeżeli komórka nie otrzymuje sygnałów życia przestaje pełnić swoją dotychczasową funkcję. Uruchamia ona wówczas swój wewnętrzny program samobójczej śmierci. Czasami komórka taka rozpoznawana jest przez układ immunologiczny organizmu jako obca. Komórki układu immunologicznego stymulują ją z zewnątrz do rozpoczęcia procesu swojej śmierci.

Liczne badania przeprowadzone w ostatnich latach nad procesem apoptozy pozwoliły rozszerzyć wiedzę na temat szlaków przekazywania sygnałów do apoptozy.

Okazało się, iż:

DROGA ZEWNĘTRZNA wiedzie nie tylko przez:

1) pobudzenie błonowych receptorów śmierci, które posiadają wewnątrzkomórkową domenę zwaną DD (domena śmierci – death domain),

lecz także przez:

2) atak limfocytów T cytotoksycznych. Limfocyty te rozpoznają komórki zniszczone lub zainfekowane wirusem, i inicjują apoptozę by uchronić komórkę od przekształcenia nowotworowego lub infekcji wirusowej. Limfocyty T produkują perforynę, granzym B. Perforyna powoduje perforacje błony komórkowej komórki wbudowując się w nią i tworząc duży kanał błonowy, umożliwiając wnikanie do komórki granzymów. Granzym B - enzym proteolityczny aktywuje kaskadę kaspaz. Do komórki równocześnie wnikają z płynu zewnątrzkomórkowego jony Ca^{+2} . Stąd też obecność zwiększonego stężenia jonów Ca^{+2} uważa się za sygnał śmierci.

3) połączenie białek błonowych Fas i FasL w obrębie tej samej komórki. Niektóre komórki wchodzące na drogę apoptozy posiadają te obydwie białka błonowe. Połączenie tych białek ze sobą aktywuje kaskadę kaspaz.

W drodze zewnętrznej apoptozy istotną rolę odgrywają błonowe receptory śmierci. Efektem wiązania receptora z ligandem jest aktywacja najczęściej kaspazy 8, rzadziej 10, czy 2. Aktywne formy kaspaz rozpoczynają kaskadę kaspaz.

Do chwili obecnej opisano kilka błonowych receptorów śmierci.

Najważniejsze z nich to:

- *TNFR-1* (tumor necrosis factor receptor 1) wiąże się z TNF alfa, który produkowany jest przez limfocyty T lub aktywne makrofagi w odpowiedzi na infekcję (Schmitz 2000). Wiązanie to powoduje trimeryzację wewnątrzkomórkowych domen śmierci (DD-death domain), co z kolei prowadzi do wiązania wewnątrzkomórkowej cząsteczki adaptorowej i powstania TRADD (TNFR associated death domain). TRADD może powołać TRAF-2 (TNF associated factor 2), co w rezultacie prowadzi do pobudzenia genów pro zapalnych i immunomodulujących. TRADD może również powołać FADD (Fas associated death domain), które trawi prokaspazę 8 i prowadzi tym samym do apoptozy (Depuydt 2005). TNFR-1 może łączyć się również z innym wewnątrzkomórkowym białkiem RAIDD (receptor interacting protein associated ICH-1/CED-3 homologous protein with DD), które przez interakcje z cząstką podobną do efektoru domeny śmierci zwaną CARD (caspase recruitment domain) aktywuje kaspazę 2, co również prowadzi do apoptozy.

- *CD95/Fas/Apo-1*. (CD95-cell death 95) Ligandem dla niego jest C95L (cell death 95 ligand) lub FasL. Jest to trimer, który w połączeniu z receptorem powoduje trimeryzację receptora. Połączenie się części receptora zwanej DD (domeną śmierci) z białkiem adaptorowym FADD (Fas associated death domain) poprzez interakcje pomiędzy homologicznymi domenami śmierci na receptorze i na FADD. Powoduje powstanie kompleksu Fas-FADD. FADD oprócz DD ma również DED (death effector domain), co pozwala pro-kaspazie 8 lub 10 dołączyć się do kompleksu. Pro-kaspaza 8 (*FLICE* - FADD-like IL-1beta converting enzyme) lub 10 łączy się z FADD przez jej własny DED. Kompleks Fas-FADD- pro-kaspaza 8 lub 10 zwany jest DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Kischkel 2001). Następuje przejście pro-kaspazy 8 lub 10 odpowiednio w kaspazę 8 lub 10.

If a cell does not receive the signals of life, it ceases to serve its current function. Thus it starts its internal suicide program. Such a cell is sometimes recognized by the immune system as a foreign one. It is stimulated externally to begin the process of its death by the immune cells.

In recent years, numerous studies about the apoptosis process have led to an increased knowledge of the signal transduction pathways leading to apoptosis. It was found that:

EXTERNAL PATHWAY not only lead to:

1) the stimulation of membrane death receptors which have an intracellular domain called DD (death domain),

but also to:

2) cytotoxic T lymphocytes attack. These lymphocytes recognise cells that are infected with a virus or damaged, and they initiate apoptosis to protect the cell from malignant transformation or viral infection. T lymphocytes produce perforin and granzyme B. Perforin causes the cell membrane to perforate by inserting itself into it, creating a large membrane channel, and allowing granzyme penetration into the cell. Granzyme B - proteolytic enzyme activates the caspase cascade. Ca^{+2} ions from an extracellular fluid invade the cell simultaneously. Hence the presence of increased concentrations of Ca^{+2} is considered as a signal of death.

3) a combination of membrane proteins Fas and FasL within the same cell. Some of the cells when entering the path of apoptosis have both these membrane proteins. The combination of these two proteins activates the caspase cascade.

In the external way of apoptosis an important role is played by membrane death receptors. The effect of ligand-receptor binding is usually the activation of caspase-8, rarely 10 or 2. Active caspase forms start the caspase cascade.

To date, several types of membrane death receptors have been described. The most important are:

- TNFR-1 (tumour necrosis factor receptor 1) combines with TNF-alpha, which is produced by T cells or active macrophages in response to infection (Schmitz 2000). This binding causes trimerization of intracellular death domain (DD, death domain), which in turn leads to binding of intracellular adapter molecules and the formation of TRADD (TNFR-associated death domain). TRADD may arouse TRAF-2 (TNF-associated factor 2), which in turn leads to stimulation of inflammatory and immunomodulatory genes. TRADD can also set up FADD (Fas associated death domain), which digests procaspase 8 and therefore leads to apoptosis (Depuydt et al. 2005).

TNFR-1 can also combine with other intracellular protein - RAIDD (receptor-associated protein interacting protein homologous ICH-1/CED-3 with DD), which by the interaction with the particle-like death effector domain called CARD (Caspase recruitment domain) activates caspase 2, which also leads to apoptosis.

- CD95/Fas/Apo-1. (CD95-cell death 95) The ligand for it is C95L (cell death 95 ligand) or FasL. It is a trimer which in combination with the receptor results in receptor's trimerization. The conjugation of a part of the receptor called DD (death domain) with the adaptor protein FADD (Fas associated death domain) through interactions between the homologous death domains receptor and FADD evokes the complex Fas-FADD. FADD besides DD has also DED (death effector domain) which allows procaspase 8 or 10 to join the complex. Pro-caspase 8 (*FLICE* - FADD-like IL-1beta converting enzyme) or 10 combines with FADD by means of its own DED. The complex of Fas-FADD-pro-caspase 8 or 10 is called DISC (Death Inducing Signalling Complex) (Kischkel 2001). The transition of a pro-caspase 8 or 10 respectively into caspase 8 or 10 begins.

- *TRAIL-R1, TRAIL-R2* (DR4, DR5 – death receptor 4, 5) Ligandem dla tych receptorów jest cytokina TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (Mroz 2003).
- *NGFR* (nerve growth factor receptor) ligandem dla niego jest NGF alfa.

Faza wykonawcza apoptozy jest nieodwracalna. Istotnym składnikiem tej fazy apoptozy są proteazy cysteinowe z rodziny ICE (interleukin-1-beta-converting enzyme) zwaną rodziną kaspaz (Kilianska 2003). Kaspazy trawią białka w miejscu za resztą asparaginianową. W procesie tym wykorzystują jedną ze swoich reszt cysteinowych (Sulejczak 2000). Stąd pochodzi ich nazwa – kaspazy (cysteine-dependent asparaginian specific proteases) Enzymy te w komórkach występują w formie nieczynnej (proenzymy, zymogeny, pro-kaspazy) i ulegają aktywacji podczas apoptozy. Aktywują one siebie wzajemnie oraz inne enzymy.

Wynikiem ich działania jest:

- Uszkodzenie białek cytoszkieletu, topoizomeraż, kinaz, błony jądrowej, białka PARP (poly ADP-Ribose Polymerase), odpowiedzialnej za naprawę DNA.
- Uszkodzenie enzymów jądrowych,
- Pocięcie DNA między poszczególnymi nukleosomami
- Kaspazy uczestniczą również w aktywacji transglutaminazy i kinaz, (odpowiedzialnych za modyfikacje biochemiczne w błonach komórkowych), przez co ciało apopotyczne posiada zwartą błonę komórkową, co zapobiega wylewaniu się jego zawartości na zewnątrz, a równocześnie rozpoznawane jest przez sąsiednie komórki i przez nie fagocytowane.

Do chwili obecnej odkryto i opisano 14 kaspaz (Izdebska 2005). Podzielono je na: inicjujące, efektorowe i prozapaalne.

Indukcja apoptozy przez receptory śmierci prowadzi do aktywacji kaspaz inicjujących (8, czy 10), które zawierają domeny efektorowe śmierci (DED). W odpowiedzi na związanie receptorów śmierci kaspazy inicjujące są aktywowane w wyniku dimeryzacji w wielobiałkowych kompleksach DISC (Pryjma 2004). Kaspaza 8/FLICE/MAC/Mch5 (Fadd-like ICE/Mammalian CED-3 homologue). Aktywowana przez receptory śmierci, aktywuje kaskadę kaspaz ale jest również bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3 (Stennicke 2000). Kaspaza 10/FLICE-2/Mch4 (Fadd-like ICE 2/Mammalian CED-3 homologue 4).

Kaspazy efektorowe (3, 6, 7) uczestniczą lub inicjują niszczenie DNA komórkowego, co prowadzi to do zniszczenia komórki.

Wszystkie kaspazy mogą zostać aktywowane również przez granzym B uwalniany przez limfocyty T lub komórki NK (natural killer).

Faza degradacji apoptozy jest to faza, w której dokonuje się apoptoza. Rozpoczyna się ona od niszczenia jądrowego DNA.

Wszelkie szlaki wiodące do fazy degradacji w apoptozie kończą się na kaspazie 3. Do tej pory opisano ok. 60 białek niszczących DNA, które aktywuje kaspaza 3. Są to między innymi DNazy-enzymy trawiące DNA oraz RNazy, enzymy trawiące RNA.

Odkryto dwie nukleazy apopotyczne. Endonukleaza DFF lub CAD (DNA fragmentation factor lub Caspase-activated DNase) Jest to DNaza trawiąca jednocześnie obie nici DNA. Jest ona zależna od jonów wapnia i magnezu. Tnie ona DNA jądrowe pomiędzy nukleosomami na odcinki 180 par zasad (Sulejczak 2000). DFF składa się z dwu elementów, z których DFF40 ma właściwości nukleazy, a DFF45, regulatora nukleazy. Endonukleaza G (EndoG) magazynowana w mitochondriach jest RNazą i DNazą równocześnie, trawiąca tylko jedną nić DNA.

W komórkach apopotycznych nukleazy przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie trawią DNA. Degradacja DNA przebiega w dwu etapach: na duże fragmenty (3000.000-50.000 par zasad), a potem na oligonukleosomy (180-200 par zasad) (Pryjma 2004)].

- TRAIL-R1, TRAIL-R2 (DR4, DR5 – death receptor 4, 5) The ligand of these receptors is a cytokine TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (Mroz 2003).

- NGFR (nerve growth factor receptor) is a ligand to alpha-NGF.

The executive phase of apoptosis is irreversible. An essential component of this apoptosis phase is the cysteine proteases, a member of caspase ICE family (interleukin-1 beta-converting enzyme) (Kilianska 2003). Caspases digest the protein in situ after the rest of the aspartate. In this process, they use one of its cysteine residues (Sulejczak 2000). Hence comes the name – the caspases (cysteine-dependent asparaginian specific proteases). In cells these enzymes are present in a latent form (proenzyme, zymogene, pro-caspases) and they are activated during apoptosis. They activate each other and other enzymes.

The result of their actions is:

- The damage of cytoskeleton proteins, topoisomerase, kinases, nuclear membrane, protein PARP (poly ADP-Ribose Polymerase), responsible for DNA repair.

- The damage to nuclear enzymes,

- Cutting DNA between nucleosomes,

- Caspases are also involved in the activation of transglutaminase and kinases (responsible for biochemical changes in cell membranes), for this reason, an apoptic body has a compact cell membrane which prevents its contents from pouring outside the cell, and yet it is recognized by neighbouring cells and phagocytosed by them.

Until now 14 caspases have been discovered and described (Izdebska 2005). They were divided into: initiation, effector and proinflammatory.

The induction of apoptosis by death receptors leads to activation of initiator caspases (8 or 10), which contain the death effector domain (DED). In response to the death receptors binding, initiator caspases are activated as a result of multiproteincomplexes dimerization DISC (Pryjma 2004). Caspase 8/FLICE/MAC/Mch5 (FADD-like ICE /Mammalian CED-3 homologue), activated by death receptors, activates the caspase cascade, but, moreover, it is also a direct activator of caspase-3 (Stennicke 2000) Caspase 10/FLICE-2/Mch4 (Fadd-like ICE 2/Mammalian CED-3 homologue 4).

Effector caspases (3, 6 and 7) are involved in or initiate cellular DNA damage, which leads to destruction of the cell.

All caspases can also be activated by granzyme B that is released by T cells or NK cells (natural killer).

The apoptosis degradation phase is the phase in which apoptosis takes place. It begins with the destruction of nuclear DNA.

All paths leading to the apoptosis degradation phase end on caspase 3. To date, about 60 proteins that take part in destroying DNA and activate caspase 3 have been described. The proteins included are DNA digesting enzymes and RNase - RNA-digesting enzymes.

Two apoptotic nuclease were discovered. Endonuclease DFF or CAD (DNA fragmentation factor lub Caspase-activated DNase) This is Dnase which digest both DNA strands. It is dependent on calcium and magnesium ions. It cuts DNA between nucleosomes to the nuclear sections of 180 base pairs (Sulejczak 2000). DFF is composed of two elements in which DFF40 has the properties of nuclease and DFF45 has the properties of regulator nucleases. Endonuclease G (EndoG) stored in the mitochondria is at the same time Rnase and Dnase, digesting only one strand of DNA.

In apoptotic cells, nucleases migrate to the nucleus where they digest DNA. DNA degradation proceeds in two stages: firstly, it is degraded into large fragments (3000.000-50.000 base pairs), and then to oligonucleosomes (180-200 base pairs) (Pryjma 2004).

Kaspazy efektorowe niszczą również białka cytoszkieletu m. in. aktynę, co jest powodem charakterystycznych zmian morfologii komórek apoptotycznych (Pryjma 2004).

Zmiany w morfologii komórki apoptotycznej przebiegają w kilku charakterystycznych etapach: Komórka tracąc wodę kurczy się, przez co zmniejsza swoją objętość AVD (apoptotic volume decrease) (Jabłoński 2006). Następnie obserwowane jest pofałdowanie powierzchni komórki związane z nią zmianą struktury błony komórkowej (cząsteczki fosfatydyloseryny dotychczas skierowane do cytoplazmy pojawiają się na powierzchni błony komórkowej). Następnym etapem jest kondensacja i brzeżne ułożenie chromatyny jądra komórkowego – charakterystyczne grudki (chromatyna to kompleks jądrowego DNA i białek) Kondensacja cytoplazmy pociąga za sobą zmiany w organellach komórkowych: poszerzenie i rozpad zbiorników ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego, pocięcie DNA dzięki działaniu endonukleaz - rozkład DNA postępuje precyzyjnie na odcinki wielkością odpowiadające odległościom między sąsiadującymi nukleosomami.

Obserwowane wypuklenie się błony komórkowej prowadzi do pączkowania pęcherzyków apoptotycznych (ciałek apoptotycznych) z powierzchni komórki („komórka wrze”). Pęcherzyki te zawierają m. innymi: fragmenty jądra komórkowego, inne organella.

Komórka fragmentuje się na ciała apoptotyczne, które rozpoznawane są przez komórki układu odpornościowego oraz sąsiadujące z nimi inne komórki (Fadok 2000). Pofragmentowane elementy komórki zostają wchłonięte na drodze fagocytozy. Fagocytoza szczątków komórki następuje bez powstania odczynu zapalnego. Apoptotyczna śmierć komórki trwa od kilku do kilkunastu godzin.

Effector caspase also destroys the cytoskeletal proteins, e.g. actin, which is the reason for the characteristic morphological changes of apoptotic cells (Pryjma 2004).

Changes in the morphology of apoptotic cells proceed in several characteristic stages: the cell loses water and shrinks by reducing its AVD volume (apoptotic volume decrease) (Jablonski 2006). Then, the folding of cell surface is observed that is associated with change in the structure of the cell membrane (phosphatidylserine molecules previously directed to cytoplasm appear on the surface of the cell). The next step is the condensation and the marginal position of chromatin nucleus – typical papules (chromatin is a complex of nuclear DNA and proteins). The cytoplasmic condensation involves changes in cell organelles: expansion and collapse of granular endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, cutting DNA owing to endonuclease actions - DNA degradation has an exact impact on the segments corresponding to the size of the distances between neighbouring nucleosomes.

The cell membrane folding, that can be observed, leads to budding of apoptotic vesicles (apoptotic bodies) from the cell surface ("the cell is boiling"). These bubbles contain, e.g.: fragments of the nucleus and other organelles.

The cell fragments itself into apoptotic bodies, which are recognized by immune cells and other neighbouring cells (Fadok 2000). The fragmented cell's elements are absorbed through phagocytosis. Phagocytosis of cell fragments occurs without the inflammatory reaction.

Apoptotic cell death takes up to several hours.

LITERATURA/BIBLIOGRAPHY

1. Bielak-Żmijewska A.: Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych.* 52: 157-171, 2003;
2. Chmielewski M., Linke K., Zabel M., Szuber L.: Apoptosis in the liver. *Gastroent Pol.* 10: 453-462, 2003;
3. Dash PR., Cartwright JE., Baker PN., Johnstone AP., Whitley GS.: Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation. *Exp Cell Res.* 287: 314-24, 2003;
4. Depuydt B., van Loo G., Vandenabeele P., Declercq W.: Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a t-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J Cell Sci.* 118: 497-504, 2005;
5. Fadok V., Bratton DM., Rose A., Pearson R., Alan B., Ezekewitz PM., Henson PM.: A receptor for phosphatidylserine – specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 405: 85-90, 2000;
6. Izdebska M., Grzanka A., Ostrowski M.: Rak pęcherza moczowego – molekularne podłoże genety i leczenia. *Kosmos.* 54: 213-220, 2005;
7. Jablonski EM., Hughes FM Jr.: The potential role of Caveolin-1 in Inhibition of Aquaporins during the AVD. *Biol Cell.* 98: 33-42, 2006;
8. Kiliańska ZM., Miskiewicz A.: Kaspazy kregowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom.* 30: 129-15, 2003;
9. Kischkel FC., Lawrence DA., Tinel A., Leblanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar AI.: Death receptor recruitment of endogenous caspase –10 and apoptosis initiation in the absence of caspase 8. *J Biol Chem.* 276: 46639-46646, 2001;
10. Lockshin RA., Zakeri Z.: Apoptosis autophagy and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2405-19, 2004;
11. Mroz P., Młynarczuk I.: Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowania TRAIL w terapii nowotworów. *Post Biol Kom.* 30: 113-12, 2003;
12. Pedrycz-Wieczorska A. Immunohistochemical, histological and ultrastructural assessment of the effects of l-arginine as a nitric oxide (no) substrate on adriamycin-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells and hepatocytes. Habilitation thesis. 2006;
13. Pryjma J.: Monocyty krwi obwodowej – apoptoza po fagocytozie bakterii oraz amiany funkcjonalne w następstwie kontaktu z komórkami apoptotycznymi www.fnp.org.pl/programy_aktualne/jachranka/profPryjma.pdf. 1-19, 2004;
14. Schmitz I., Kirchhoff S., Krammer P.H.: Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 1123-1136, 2000;
15. Stennicke HR.: Caspases--at the cutting edge of cell death. *Symp Soc Exp Biol.* 52: 13-29, 2000;
16. Sulejczak D.: Apoptosis and methods of identification of this phenomenon. *Post Biol Kom.* 27: 527-568, 2000.

DEATH RECEPTORS – EXTRINSIC PATHWAY OF APOPTOSIS

Apoptosis is a strictly regulated, natural process of programmed cell death in multicellular organism. Via this process, worn-out or damaged cells are removed from the body. There are two basic paths to signal the induction of apoptosis - external and internal. The external path, which this work is devoted to, is induced by external factors stimulating membrane receptors which have the intracellular domain called death domain or cytotoxic T lymphocyte attack. It is also possible to initiate apoptosis by a combination of membrane proteins Fas and FasL within the same cell.

The study analyses the characteristics of some membrane receptors called death receptors, that are stimulated in the course of an external track of induction signal to apoptosis. Receptors taken into account are: TNFR-1, CD95 / TRAIL-R1, TRAIL-R2, NGFR.

Keywords: death receptors, apoptosis.

ВНЕШНИЙ ПУТЬ СИГНАЛА К ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА - РЕЦЕПТОРОВ СМЕРТИ

Апоптоз является строго регламентированным, естественным процессом запрограммированной гибели клеток у многоклеточных организмов. С его помощью удаляются из тела погибшие и поврежденные клетки. Существуют два основных пути индукции сигнала апоптоза- внешний и внутренний.

Внешний путь, которому посвящена эта работа - это путь, индуцированный внешним фактором, стимулирующим мембранные рецепторы с внутриклеточного домена, которые называются домен смерти (death domain) или атака цитотоксических Т-лимфоцитов. Кроме того, можно также инициировать апоптоз комбинацией мембранных белков Fas и FasL в той самой клетке.

В исследовании были проанализированы свойства некоторых мембранных рецепторов, известных как рецепторы смерти, стимулированных сигналом в процессе индукции внешнего пути к апоптозу. Рецепторы, которые были рассмотрены: TNFR-1, CD95 / TRAIL-R1, R2-TRAIL, NGFR.

Ключевые слова: рецепторы смерти, апоптоз.