บทปริทัศน์

กลวิธานทางชีวเคมีในกระบวนการตายของเซลล์

ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์

บทคัดย่อ

กระบวนการตายของเซลล์เป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้ตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่เป็นอันตรายของเซลล์ แบ่งได้หลายแบบทั้งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่านและ/หรือจากกลไกทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้อง โดยสรุปแบ่งเป็นกลไกที่เกิดจากการกระตุ้นภายในเซลล์เอง (intrinsic pathway) ซึ่งเริ่มต้นจากมีการรั่วไหลของไซโตโครม C ออกจากไมโตคอนเดรีย ยังผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ caspase-9 ในที่สุด ส่วนกลไกที่เกิดจากการกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) นั้น เริ่มจากการกระตุ้นผ่านทางตัวรับจำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ชนิด death receptors เช่น การกระตุ้นของ Fas ligand แล้วส่งผลต่อมาทำให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ caspase-8 หรือ caspase-10 ในที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งได้อีกแบบตามการกระตุ้นของเอนไซม์ caspase เป็นกลไกการตายของเซลล์ที่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ caspase (caspase dependent PCD) หรือที่รู้จักกันดีในนามของ apoptosis PCD และ กลไกการตายของเซลล์ที่ไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ caspase (caspase independent PCD) ซึ่งแบ่งย่อยได้อีกเป็น autophagy PCD และ apoptosis-like PCD หรือ Paraptosis PCD อย่างไรก็ดี เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการตายแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับตัวกระตุ้นและลำดับขั้นของกลไกที่ตามมาและไม่ได้เกิดขึ้นโดยอาศัยแค่เพียงกลไกใดกลไกหนึ่งเท่านั้น แต่เซลล์จะอาศัยการกระตุ้นผ่านทางหลายๆ กลไกไปพร้อมๆ กัน เพื่อชักนำตัวเองเข้าสู่กระบวนการตาย เซลล์ที่ตายแล้วเหล่านี้โดยธรรมชาติก็จะถูกกำจัดต่อโดยกลุ่ม phagocytic cells ทั้งหลายในร่างกาย แต่หากกลไกเหล่านี้ผิดปรกติไป นั่นแสดงว่าเซลล์สามารถรอดชีวิตจากสิ่งกระตุ้นให้ตายได้และกลับเจริญเติบโตต่อไป จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุดนั่นเอง

คำสำคัญ : กระบวนการตายของเซลล์, อะพอพโทซิส, กระบวนการตายของเซลล์แบบที่เหมือนอะพอพโทซิส, พาแรพโทซิส, วิถีพึ่งคาสเปส, วิถีไม่พึ่งคาสเปส

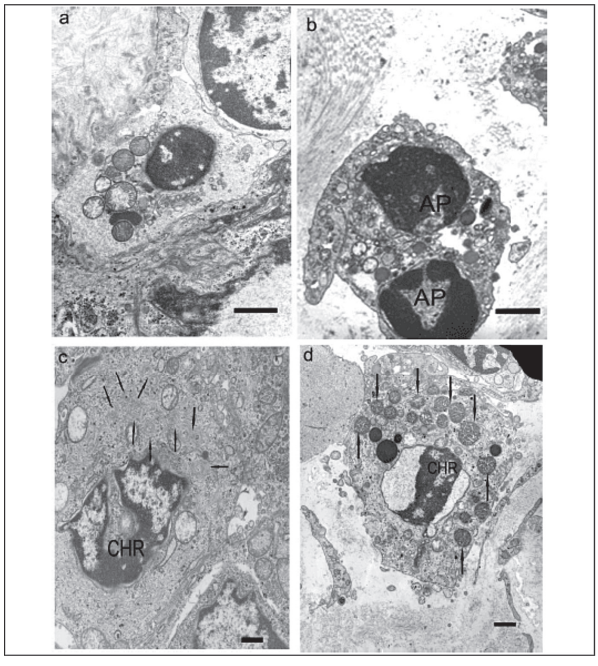
บทนำ

Programmed cell death (PCD) เป็นกลไกสำคัญของเซลล์ในการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นหรือสิ่งเร้าที่เป็นอันตรายของเซลล์ เพื่อทำให้อวัยวะที่เซลล์เหล่านั้นประกอบอยู่ยังคงสามารถดำรงความเป็นปรกติไว้ได้ หากกระบวนการนี้ถูกยับยั้ง ก็จะทำให้เซลล์นั้นๆ เป็นอมตะ ส่งผลต่อมาก็คือทำให้สามารถเจริญเติบโตได้อย่างไม่มีขีดจำกัด จนทำให้อวัยวะที่มีเซลล์นั้นๆ อยู่ พัฒนาเป็นมะเร็งในที่สุด

PCD สามารถแบ่งได้หลายแบบทั้งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ organelle ทั้งหลายที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและ/หรือจากกลไกที่เกี่ยวข้อง โดยสรุปแบ่งเป็น caspase dependent PCD หรือที่รู้จักกันดีในนามของ apoptosis PCD[1,2] โดยนอกจากจะพบลักษณะของ chromatin condensation ที่เป็นรูปทรงทางเรขาคณิตที่ชัดเจน (อาจเป็น globular, crescent-shaped ก็ได้) แล้วยังพบ DNA fragmentation, membrane blebbing ร่วมกับ cytoplasmic shrinkage[3] และ/หรือมีการ form apoptosis bodies with nuclear fragments ให้เห็นในเซลล์ที่เกิด apoptosis PCD อีกด้วย ในทางตรงข้าม PCD อีกกลุ่มหนึ่งนั้นเป็น PCD ที่เป็น caspase independent PCD ซึ่งแบ่งย่อยได้อีกเป็น autophagy PCD (self-digestion in Greek)[4,5] ซึ่งจะพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ organelle ทั้งหลายที่แตกต่างจากที่พบใน apoptosis PCD กล่าวคือจะพบ Sequestration of bulk cytoplasm และพบ dense organelle-containing vacuoles แต่ไม่พบ chromatin condensation ดังเช่นที่พบใน apoptosis PCD ดังเช่นที่ Motyl และคณะ[6] ได้ศึกษาเปรียบเทียบ morphology ของเซลล์เต้านม

สาขาชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

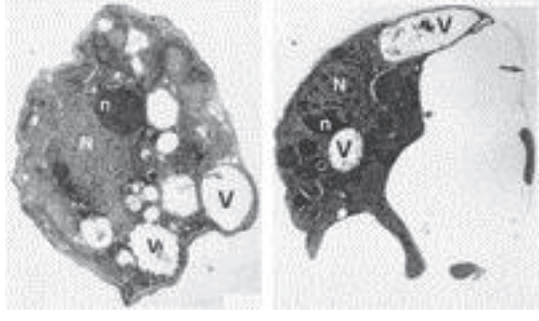
ของวัวที่เกิดการตายแบบ apoptosis PCD เทียบกับ autophagy PCD ในรูปที่ ๑



(a) late stage of apoptosis ซึ่งจะพบ chromatin condensation
(b) แสดง apoptosis bodies (AP) ในซากเซลล์ที่ตายจาก apoptosis PCD
(c) early stage of autophagy แสดงให้เห็นถึง disorganize ของ cytoskeletal element (ลูกศรชี้)
(d) late stage of autophagy แสดงให้เห็นถึง dense organelle-containing vacuoles (ลูกศรชี้)

รูปที่ ๑ แสดง morphology ของเซลล์เต้านมของวัวที่เกิดการตายแบบ apoptosis PCD (a, b) เทียบกับ autophagy PCD (c, d) (จาก Motyl *et al,* 2006[๖])

สำหรับ caspase independent PCD อีกชนิดหนึ่งได้แก่ Paraptosis PCD (Paraptosis แปลว่า next or related to apoptosis)[๗-๑๐] เป็น apoptosis-like PCD ที่เกิดจากการกระตุ้นตัวรับชนิด TNF receptor family member TAJ/TROY (TNF receptor family member toxicity and JNK inducer TNF Receptor family member expressed in embryonic skin and hair follicles)[๙] หรือ IGFIR (insulin-like growth factor I receptor)[๗] ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นผ่านทาง mitogen-activated protein kinases มีลักษณะเด่นชัดตรงที่จะพบ vacuole กระจายเต็ม cytoplasm ของเซลล์ (cytoplasmatic vacuolation) ร่วมกับมีการบวมของ mitochondria และ Endoplasmic reticulum (ER) โดยที่ไม่พบ apoptosis bodies และ/หรือ nuclear fragmentation ดังเช่นที่พบใน apoptosis PCD ดังแสดงลักษณะทาง morphology ของเซลล์ที่ตายแบบ Paraptosis PCD ในรูปที่ ๒ อย่างไรก็ดี พบว่าเซลล์ปรกติสามารถถูกกระตุ้นให้เข้าสู่ programmed cell death ได้หลายทางในเวลาเดียวกัน โดยผลที่เห็นได้นั้นจะมาจากกลไกที่เกิดได้เร็วและมีประสิทธิภาพที่สุด[๑๑-๑๓]



รูปที่ ๒ แสดง morphology ของเซลล์ *Dictyostelium discoides* ที่เกิดการตายแบบ apoptosis-like PCD (Paraptosis)(จาก Wyllie and Golstein, 2001[๑๔])
(ขวา) แสดงให้เห็นถึง vacuoles เต็ม cytoplasm เทียบกับ normal control (ซ้าย)

นอกจากนี้ หากจะอธิบาย PCD ผ่านทางกลไกระดับเซลล์นั้น สามารถอธิบายได้เป็น ๒ ทางใหญ่ๆ จากผลของการกระตุ้นให้เซลล์มีการตายโดยผ่านหรือไม่ผ่าน caspase กล่าวคือเป็น caspase dependent PCD หรือ apoptosis PCD และ caspase independent PCD หรือ apoptosis-like PCD

caspase dependent PCD หรือ apoptosis PCD

ประกอบด้วย 2 pathway ใหญ่ๆ คือ Extrinsic pathway หรือ death receptor pathway และ intrinsic pathway หรือ mitochondrial pathway[๔,๑๕]

Extrinsic pathway: เริ่มต้นจากมีตัวกระตุ้น (death signal)[๑๖-๑๘] เช่น TNF-α (tumor necrosis factor-α), Fas L (Fas ligand) Trail/Apo2L (TNF-related apoptosis-inducing ligand: also called Apo2L), Apo3L มาจับที่ receptor ซึ่งอาจเรียกให้

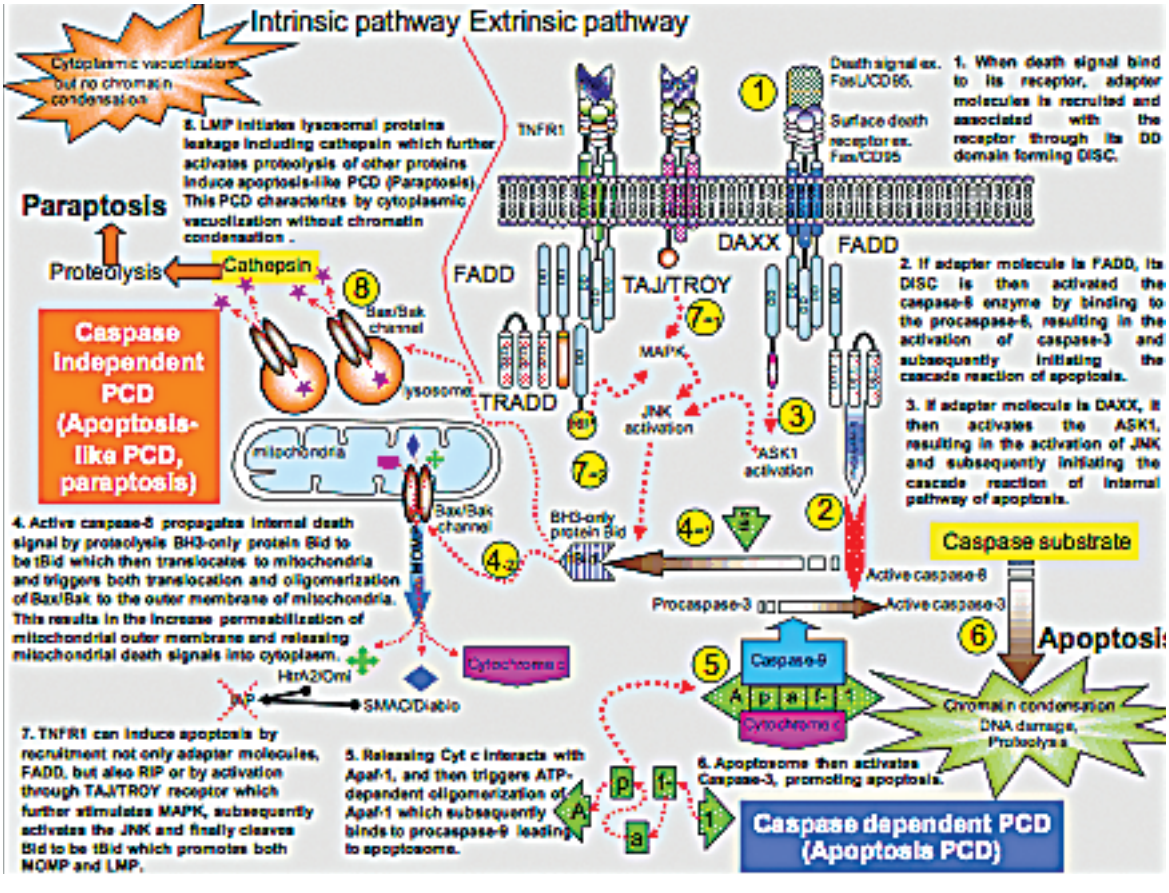
เฉพาะเจาะจงว่าเป็นกลุ่มของ death receptor ซึ่งเป็นกลุ่มของ integral membrane protein ที่มีส่วน conserved motif ที่เรียกว่า death domain (DD) พาดเข้ามาในส่วน cytoplasm ของเซลล์ ซึ่งส่วนของ DD ที่พาดเข้ามาใน cytoplasm นี้ส่งผลตามมาก็คือ ทำให้เกิด death inducing signal complex (DISC) (แสดงด้วยหมายเลข ๑ ในรูปที่ ๓) ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของ (homotypic interaction) death domain ของกลุ่ม receptor เหล่านี้ ไม่ว่าจะเป็น Tumor Necrosis Factor Receptor-1 (TNFR-1), Fas receptor กับ TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain), FADD (Fas-associated death domain protein) ซึ่งเป็น adaptive molecule ของโปรตีนเหล่านี้ ส่งผลต่อมาโดยที่ DISC ที่เกิดขึ้นนี้สามารถจะไปกระตุ้น procaspase-8 ให้อยู่ในรูปว่องไวคือรูปของ caspase-8 จากนั้น active caspase-8 สามารถไปออกฤทธิ์ได้ ๒ ทางขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ โดยทางแรก active caspase-8 จะไปกระตุ้น caspase-3 ให้อยู่ในรูปว่องไวอีกทอดหนึ่ง (แสดงด้วยหมายเลข ๒ ในรูปที่ ๓) caspase-3 เป็นเอนไซม์กลุ่ม cysteine protease ที่มีหน้าที่ย่อยโปรตีนต่างๆ โดยอาศัย nucleophilic group ของตัวเองช่วยในการจัดการกับ substrate และตัดพันธะเปปไทด์ทางสาย carboxyl end บริเวณ aspartic residues ของ substrate นั้นๆ ผลจึงเกิด proteolysis ของโปรตีนต่างๆ จนท้ายสุดจึงทำให้เซลล์เข้าสู่ apoptosis ในที่สุด ส่วนอีกทางหนึ่ง active caspase-8 ที่เกิดขึ้นนี้ จะกระตุ้นให้เกิด intrinsic pathway โดยไปตัดสายโปรตีน Bid (Bcl-2 interacting domain death)[๑๙] ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนกลุ่ม BH3-family (Bcl-2 homology region 3) ยังผลให้ได้เป็น truncated protein ที่เรียกว่าโปรตีน tBid (truncated BH3 interacting domain death) (แสดงด้วยหมายเลข 4-1 ในรูปที่ 3) ซึ่งจะไปมีผลปลุกฤทธิ์โปรตีน Bax (Bcl-2–associated X protein) และ/หรือ Bak (Bcl 2 antagonist killer) โดยทำให้อยู่ในรูป oligomerize form ทำให้โปรตีนดังกล่าวสามารถจะ migrate จาก cytoplasm ไปยัง mitochondria แล้วไปจับที่ mitochondria membrane ทำให้เพิ่ม permeability ของ outer membrane ของ mitochondria ยังผลให้เกิดการปลดปล่อย Cytochrome *c* (Cyt *c*) ออกมาใน cytoplasm (แสดงด้วยหมายเลข 4-2 ในรูปที่ 3) ผลโดยรวมต่อมาก็คือชักนำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการ apoptosis[๒๐-๒๒] นอกจากนี้ยังพบว่า DISC ที่เกิดขึ้นนอกจากจะเกิดจากการรวมตัวของโปรตีนหลากหลายชนิด รวมทั้ง Fas ligand กับ TRADD และ/หรือกับ FADD ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบว่า Fas ligand สามารถรวมตัวกับโปรตีน DAXX (Death-Domain-Associated Protein) แทน FADD แล้วส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ Apoptosis-Signal-Regulated Kinase-1 (ASK-1) ซึ่งจะไปกระตุ้น C-Jun N-terminal kinases (JNK) (แสดงด้วยหมายเลข ๓ ในรูปที่ ๓) ส่งผลให้กระตุ้น intrinsic pathway ที่จะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป ผลสุดท้ายจึงทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis PCD

Intrinsic pathway: เริ่มจากมีตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ เช่น activated JNK, pro-apoptosis protein, ภาวะที่มีการทำลาย DNA (DNA damage), oxidative stress, heat shock ทั้งหลายเหล่านี้ จะมากระตุ้นการทำงานของโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family ที่เป็น pro-apoptosis proteins ให้อยู่ในรูปว่องไว อาทิ Bax (Bcl-2–associated X protein), Bad (Bcl 2 Antagonist of Cell Death), Bak (Bcl 2 Antagonist Killer), Bid (Bcl-2 interacting domain death) และ translocate ตัวเองจาก cytoplasm มายัง mitochondria เกิด oligomerize ขึ้นที่ outer membrane ของ mitochondria ทำให้เกิดเป็น channel ขึ้น ยังผลให้ mitochondria มี permeability เพิ่มขึ้น (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP) ทำให้โปรตีนกลุ่ม pro-death molecule เช่น Cyt *c* หรือ โปรตีนกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด apoptosis อาทิ Smac/Diablo (Second Mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-binding protein with low pI), HtrA2/OMI (High-temperature requirement protein A2) ซึมออกจาก mitochondria มาอยู่ที่บริเวณ cytoplasm ได้ จากนั้น Cyt *c* จะไปรวมกับ Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1)[๒๓] โดยอาศัย ATP (ATP dependent) ยังผลให้ Apaf-1 สามารถเกิด oligomerize ได้ โดยรูป oligomerize Apaf-1 นี้ทำให้ procaspase-9 สามารถมารวมตัวต่อกันอีกทอดหนึ่งโดยผ่านทาง CARD domain (Caspase Recruitment Domain) ที่พบทั้งในโปรตีนทั้ง ๒ ชนิดนี้ ทำให้ได้เป็น apoptosome complex[๒๔] (แสดงด้วยหมายเลข 5 ในรูปที่ 3) ซึ่งทำให้ caspase-9 อยู่ในรูปว่องไว และจะไปกระตุ้น caspase-3 ให้อยู่ในรูปว่องไวอีกทอดหนึ่ง (แสดงด้วยหมายเลข 6 ในรูปที่ 3) ซึ่งนอกจาก active caspase-3 จะเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยโปรตีนต่างๆ จึงทำให้เซลล์เกิด apoptosis PCD ในที่สุดแล้ว active caspase-3 ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถไปกระตุ้น downstream cascade reaction โดยไปปลุกฤทธิ์เอนไซม์กลุ่ม caspase อื่นๆ ไม่ว่าจะเป็น caspase-2, caspase-6 ซึ่งจะไปปลุกฤทธิ์ caspase-8 และ caspase-10 ต่อ ผลสุดท้ายจึงทำให้เซลล์เกิดการตายในลักษณะของ apoptosis PCD ดังแสดงภาพโดยรวมในรูปที่ ๓

จะเห็นได้ว่าโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family[๒๕] ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลากหลายชนิดทั้งที่มีฤทธิ์เป็น anti-apoptosis (ได้แก่

Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva, Bcl-B/Bcl-2L-10/Nrh) และ pro-apoptosis proteins (ได้แก่ Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-X_S, Bcl-G_L, Bad, Bid, Bik/Nbk เป็นต้น) ดังกล่าวข้างต้นนั้น ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อม (bridging signal) สัญญาณระหว่าง death receptor pathway หรือ extrinsic pathway กับ mitochondrial pathway หรือ intrinsic pathway โดยที่โปรตีนกลุ่ม pro-apoptosis member จะทำหน้าที่เป็นเหมือนตัว sensor จาก death signal ภายนอกที่ได้รับมา จากนั้นจึงทำการกระตุ้นโปรตีนอื่นๆ downstream เป็นขั้นๆ จนกระทั่งทำให้เซลล์เข้าสู่ apoptosis ในที่สุด ในทางตรงข้าม โปรตีนกลุ่ม anti-apoptosis member ก็จะทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการ apoptosis ไม่ให้เกิดขึ้น

กล่าวโดยสรุป เมื่อ caspase[๒๖] ถูกกระตุ้นให้ทำงานแล้วนั้น เนื่องจาก caspase เป็นเอนไซม์กลุ่ม Cysteine protease ก็จะไปออกฤทธิ์ย่อยโปรตีนหลากหลายชนิด อาทิ ย่อยสลายโปรตีนยับยั้ง CAD (Caspase-Activated DNase)[๒๗] ทำให้ enzyme CAD สามารถทำงานได้ ผลก็คือ พบ chromatin condensation, ย่อยสลายโปรตีน lamins ผลก็คือพบ nuclear shrinkage, ย่อยสลายโปรตีนกลุ่ม cytoskeletal protein ผลก็คือพบลักษณะของ cytosolic reorganization/ cytoplasmic shrinkage และย่อยสลายโปรตีน p21-activated kinase-2 /Rho-activated serine/threonine kinase ผลก็คือ ทำให้เห็น membrane blebbing และย่อยสลายโปรตีนอื่นๆ จนทำให้สามารถเห็นการ formation เป็น apoptosis bodies ที่มี nuclear fragments ได้ชัดเจน ดังได้อธิบายและแสดงให้เห็นดังรูปที่ ๑ ข้างต้น



รูปที่ ๓ แสดง intrinsic และ extrinsic pathway ของ apoptosis PCD และ apoptosis-like PCD

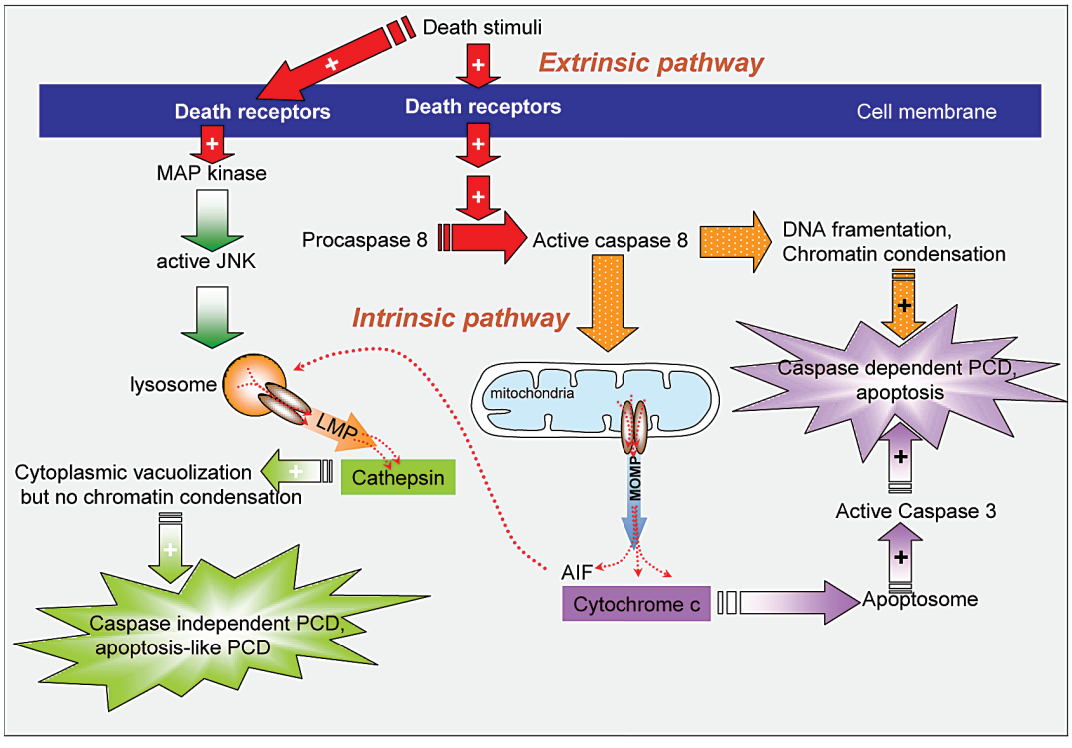
Abbreviation: Apaf, Apoptosis protease activating factor-1; ASK-1, Apoptosis-Signal-Regulated Kinase-1; Bax/Bak, Bcl-2–associated X protein/ Bcl 2 antagonist killer; Bcl2, B-cell lymphoma 2; Bid, Bcl-2 interacting domain death; Cyt c, Cytochrome c; DAXX, Death-Domain-Associated Protein; DD, Death Domain; DISC, Death Inducing Signal Complex; FADD, Fas-Associated Death Domain protein; HtrA2/OMI, High-temperature requirement protein A2 /OMI; IAPs, Inhibitor of Apoptosis Proteins; JNK, C-Jun N-terminal Kinases; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase; MOMP, Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization; RIP, Receptor Interacting Protein; Smac/Diablo, Second mitochondria-Derived activator of caspases/ Direct IAP-binding protein with low pI; TAJ/TROY, TNF receptor family member toxicity And JNK inducer/ TNF Receptor family member expressed in embryonic skin and hair follicles; PCD, Programmed Cell Death; tBid, truncated BH3 interacting domain death; TNFR-1, Tumor Necrosis Factor Receptor-1; TRADD, TNF Receptor-Associated Death Domain.

caspase independent PCD หรือ apoptosis-like cell death

พบว่ามีกลไกการกระตุ้นได้หลายทาง ทั้งจากการผ่านทาง TNF receptor family member TAJ/TROY (TNF receptor family member toxicity and JNK inducer/ TNF receptor family member expressed in embryonic skin and hair follicles) ซึ่งเป็นกลุ่มของ TFR family ที่พบ overexpress ใน embryo และเป็นกลุ่มของตัวรับต่อ TNF ที่ไม่มีส่วนของ death domain ยื่นลงมาใน cytoplasm เหมือนตัวรับจำเพาะกลุ่มอื่นๆ ที่กล่าวไปข้างต้น จากนั้นจึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ MAP kinase (Mitogen-Activated protein Kinase)[๗,๙,๒๘-๒๙] (Sperandio *et al,* 2004; Wang *et al*, 2004; Eby *et al*, 2000; Kojima *et al*, 2000) (แสดงด้วยหมายเลข ๗-๑ ในรูปที่ ๓) ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์กลุ่ม JNK ก่อให้เกิด cascade reaction ตามมา นอกจากนี้ ยังพบว่า apoptosis-like cell death หรือ paraptosis นี้ยังอาจกระตุ้นผ่านทาง IGFIR (Insulin-like Growth Factor I Receptor)[๓๐] (Sperandio *et al*, 2000) ได้อีกด้วย ซึ่งไม่ว่าจะกระตุ้นจากทางใดก็ตาม ผลพบว่า cascade reaction ที่เกิดขึ้นนั้น มีผลทำให้โปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family ที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปว่องไว แล้วไปมีผลต่อ lysosome ทำให้ lysosome มี permeability เพิ่มขึ้น (Lysosomal Membrane Permeabilization, LMP) ด้วยกลไกเดียวกันกับที่ทำให้ mitochondria มี permeability เพิ่มขึ้นดังที่เคยกล่าวไว้ข้างต้น กล่าวคือ Bid (Bcl-2 interacting domain death) ถูกตัดสายเปปไทด์บางส่วนออกได้เป็น truncated protein ที่เรียกว่าโปรตีน tBid (truncated BH3 Interacting Domain death) ซึ่งจะไปมีผลปลุกฤทธิ์โปรตีน Bax (Bcl-2–associated X protein) และ/หรือ Bak (Bcl 2 Antagonist Killer) ทำให้โปรตีนดังกล่าวสามารถจะ migrate จาก cytoplasm ไปยัง lysosome เกิด oligomerize ขึ้นที่ outer membrane ของ lysosome ทำให้เกิดเป็น channel ขึ้น ยังผลให้ lysosome มี permeability เพิ่มขึ้น[๓๑-๓๓] (Heinrich *et al,* 2004; Werneburg *et al*, 2004; Stoka *et al*, 2001) (แสดงด้วยหมายเลข 7-2 ในรูปที่ 3) จึงทำให้เอนไซม์ต่างๆ ใน lysosome ซึ่งรวมถึงเอนไซม์กลุ่ม cathepsin (เช่น cathepsin B, C, D) ซึ่งเป็น cysteine protease รั่วไหลออกมาสู่ cytoplasm เช่นกัน โดยพบว่า cathepsin B สามารถไปย่อยสลายโปรตีนอื่นๆ ได้หลากหลายทั้งไม่จำเป็นต้องผ่านและ/หรือผ่านการทำงานของ caspase-3 ก็ได้[๓๔-๓๕] (Guicciardi *et al,* 2000; Foghsgaard *et al,* 2001) (แสดงด้วยหมายเลข 8 ในรูปที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าในส่วนของ MOMP ที่เกิดขึ้นนั้น นอกจากจะเกิดจากผลของการกระตุ้นให้เกิด oligomerization ของ Bax/Bak channel ดังที่กล่าวแล้ว ยังเกิดได้จากการทำงานของ cathepsin D ที่รั่วออกมาจาก lysosome อีกด้วย ตรงจุดนี้ จึงเป็นเหมือนการเชื่อมต่อระหว่าง caspase-dependent และ caspase-independent pathway ซึ่งส่งผลต่อมาก็คือทำให้มีการรั่วไหลของ Cyt c ออกมาจากไมโตคอนเดรียในที่สุด ซึ่งส่งผลให้เกิด downstream activation ของ caspase ดังที่กล่าวไว้ในส่วนของ caspase dependent pathway อย่างไรก็ดี caspase-independent pathway ที่เกิดขึ้นนี้ นอกจากกระบวนการหลากหลายที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบว่ามีการรั่วไหลของโปรตีนกลุ่ม AIFs (Apoptosis Inducing Factors) เช่น Smac/Diablo[๓๖] และ HtrA2/OMI จาก mitochondria ออกมาอยู่ใน cytoplasm อีกด้วย ซึ่งโปรตีนกลุ่มดังกล่าวมีฤทธิ์ไปยับยั้งโปรตีนกลุ่ม IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins)[๓๖] อีกทอดหนึ่ง ทำให้โปรตีนกลุ่มนี้อยู่ในรูปเฉื่อย จึงไม่สามารถยับยั้ง apoptosis ที่กำลังดำเนินอยู่ได้ จึงเปรียบเหมือนเป็นการส่งเสริมให้เซลล์เข้าสู่ apoptosis-like PCD ได้นั่นเอง ดังแสดงภาพโดยรวมเปรียบเทียบกับ apoptosis cell death ในรูปที่ 3 สำหรับในกรณีที่กระตุ้นผ่าน caspase independent pathway พบว่าผลที่ตามมาก็คือ ชักนำให้เซลล์เข้าสู่การตายโดยมีลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ในลักษณะของ apoptosis-like PCD หรือ paraptosis cell death[๓๕, ๓๘] (Bröker *et al*, 2004; Foghsgaard *et al*, 2001) ดังแสดงให้เห็นดังรูปที่ ๒

สรุป

อย่างไรก็ดี จะเห็นได้ว่า pathway ทั้งหลายไม่ได้เกิดขึ้นโดยอาศัยเพียงวิถีใดวิถีหนึ่งเท่านั้น แต่กลับพบว่าเมื่อมีสิ่งกระตุ้นทั้งจากภายในและ/หรือภายนอกเซลล์ เซลล์จะอาศัยการกระตุ้นผ่านทางหลายๆ กลไกไปพร้อมๆ กันเพื่อชักนำตัวเองเข้าสู่กระบวนการตายแบบใดแบบหนึ่งขึ้นกับตัวกระตุ้นที่สั่งการลงมาในเซลล์ ดังแสดงภาพโดยรวมในรูปที่ ๔ หากกระบวนการดังกล่าวเป็นไปโดยปรกติ เซลล์ที่ตายแล้วเหล่านี้ก็จะถูกกำจัดต่อโดยกลุ่ม phagocytic cells ทั้งหลายในร่างกาย แต่หากกลไกเหล่านี้ผิดปรกติไป นั่นแสดงว่าเซลล์สามารถรอดชีวิตจากสิ่งกระตุ้นให้ตายได้ และกลับเจริญเติบโตต่อไป จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด



รูปที่ ๔ แสดงกลไกโดยสรุปของการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์

เอกสารอ้างอิง

๑. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980;68:251–306.

๒. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239–57.

๓. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol 1984;142:67–77.

๔. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:741-52.

๕. Leist M, Jäättela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:589-98.

๖. Motyl T, Gajkowska B, Zarzyńska J, Gajewska M, Lamparska-Przybysz M. Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. J Physiol Pharmacol 2006;57:17-32.

๗. Sperandio S, Poksay K, de BI, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. Cell Death Differ 2004;11:1066-75.

๘. Sperandio S, de BI, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:14376-81.

๙. Wang Y, Li X, Wang L, Ding P, Zhang Y, Han W, Ma D. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered byTAJ/TROYand enhanced by PDCD5 overexpression. JCell Sci 2004;117:1525-32.

๑๐. Henics T, Wheatley DN. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. Biol Cell 1999;91:485-98.

๑๑. Unal-Cevik I, Kilinc M, Can A, Gursoy-OzdemirY, DalkaraT. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. Stroke 2004;35:2189-94.

๑๒. Bursch W. The autophagosomal-lysosomal com partment in programmed cell death. Cell Death Differ 2001;8:569-81.

๑๓. Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, et al. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. Oncogene 1999;18:2281–90.

๑๔. Wyllie AH, Golstein P. More than one way to go. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:11-3.

๑๕. Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes – integrating cell survival and death. J Biosci 2007;32:595–610.

๑๖. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science 2002;296: 1635–6.

๑๗. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 2002;296:1634–5.

๑๘. Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene 2010;29:4752-65.

๑๙. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, et al. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. J Cell Biol. 1999;147:809-22.

๒๐. Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release occurs via Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-independent mechanisms that are regulated by Bax. J Biol Chem 2001;276:19066-71.

๒๑. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998;281:1309-12.

๒๒. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol 2002;192:131-7.

๒๓. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie 2002;84:215-22.

๒๔. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. Neoplasia 1999;1:5–15.

๒๕. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer 2002;2:647–56.

๒๖. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J 1997;326:1–16.

๒๗. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 1998 1;391:43-50.

๒๘. Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Sharma, K. and Chaudhary, P. M. TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. J Biol Chem 2000;275:15336-42.

๒๘. Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG., Gilbert DJ, Jenkins A, Senba E, Kitamura T. TROY, a Newly Identified Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Exhibits a Homology with Edar and Is Expressed in Embryonic Skin and Hair Follicles. J Biol Chem 2000; 275: 20742-47.

๓๐. Sperandio S, de BI, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:14376-81.

๓๑. Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, et al. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid mediated caspase-9 and -3 activation. Cell Death Differ 2004;11:550-63.

๓๒. Werneburg N, Guicciardi ME, Yin XM, Gores GJ. TNF-a-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;287:G436-43.

๓๓. Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim T-H, Cirman T, Snipas SJ, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. J Biol Chem 2001;276:3149-57.

๓๔. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, et al. Cathepsin B contributes to TNF-a-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. J Clin Invest 2000;106:1127-37.

๓๕. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, et al. CathepsinB acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. J Cell Biol 2001;153:999-1010.

๓๖. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000; 102:33–42.

๓๗. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. Genes 1999; 3:239–52.

๓๘. Bröker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA, Giaccone G. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. Cancer Res 2004;64:27-30.

Abstract

Biochemical mechanism in Programmed Cell Death: An Overview

Panadda Rojpibulstit

Biochemistry, Faculty of Medicine, Thammasat University

Programmed cell death (PCD) is the cellular process in response with any cellular dangerous stimulus. It can be divided into several types depend on ultra-structural changes detected by electron transmission microscope and biochemical pathway involving in the processes. In conclusion, two main pathways relying on an initiating point has been proposed, i.e. intrinsic and extrinsic pathway. Intrinsic pathway is initiated by the mitochondrial permeabilization resulting in cytochrome c releasing out which then activated the caspase-9. While an extrinsic pathway is started off after cell surface death receptor bound with the death signal for example Fas ligand. This event finally triggers the activation of caspase-8 or caspase-10. In addition, PCD can be divided into another two pathway according to an involvement of enzyme caspase i.e. caspase dependent or apoptosis-PCD and caspase independent- including autophagy and apoptosis-like or Paraptosis-PCD. Cells will, however, be turned to be death via which pathway depend on the type of stimuli and its cascade reaction. Actually, it does not rely on only one mechanism but depend on multi-mechanism instead. Naturally, the death cells will then be removed by those of the phagocytic cells in the body. On the other hand, if the apoptosis mechanism in any cell has been dismissed, it will lead that cell having its own talent to be still grown without dying till reaching an immortal situation i.e. finally being to be cancer.

Key words: Programmed cell death (PCD), apoptosis, apoptosis-like PCD, paraptosis, caspase dependent pathway, caspase independent pathway