

Caspase 的活化机制

王筱冰 张小翠 夏妙红 刘全宏

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要: Caspase 是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族,以 Caspase 前体酶原的形式存在大多后生动物的细胞中。Caspase 在凋亡信号的作用下首先激活启动型 Caspase 引发 Caspase 级联反应,然后通过活化的执行型 Caspase 裂解特异性底物导致细胞凋亡。Caspase 的活化是导致细胞凋亡的中心环节,位于 Caspase 级联反应上游的启动型 Caspase 的和下游的执行型 Caspase 有着明显不同的活化机制。

关键词: Caspase; 活化; 级联反应

Mechanisms of Caspase Activation

WANG Xiao-bing, ZHANG Xiao-cui, XIA Miao-hong, LIU Quan-hong

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

ABSTRACT: Caspase belongs to proteolytic enzymes family closely related to cell apoptosis, which exists in most metazoan cells as its preenzyme and plays an important role in apoptosis. Under the influence of apoptosis signals, caspase first activates initiator caspase, resulting in cascade reaction of caspase, and then splits specific substrates by executioner caspase activated to induce cell apoptosis. So the activation of caspase was the central component for inducing apoptosis, and there are different activating mechanisms between initiator caspase and executioner caspase.

Key words: Caspase; Activation; Cascade reaction

Caspase 是一类半胱氨酸蛋白水解酶,具有半胱氨酸激活位点和底物裂解位点。Caspase 家族的一个重要的共同点就是特异性地断开目的蛋白天冬氨酸残基后的肽链。Caspase 是细胞凋亡的核心成分,在程序性细胞死亡中起到重要作用。Caspase 在凋亡信号的作用下可以引发 Caspase 级联反应,根据它们进入凋亡途径的位点不同可分为启动型 Caspase 和执行型 Caspase。启动型 Caspase 在细胞死亡途径中首先被激活,然后通过逐级活化再激活执行型 Caspase,活化的执行型 Caspase 通过裂解特异性底物导致细胞凋亡。研究表明启动型 Caspase 和执行型 Caspase 具有不同的活化机制,本文就将这两种活化机制做一概述。

1 Caspase 的结构和分类

Caspase 通常以无活性的酶原形式存在大多数后生动物细胞中,其家族成员在氨基酸序列、结构及酶的特性上均相似。该酶原是一个分子量为 30-50ku 的单一多肽,由三个结构域构成,分别为 N 端前域、20ku 的大亚基单位和 10ku 的小亚基单位。酶原分子被激活后,大小亚基解离并重新组装为四聚体形式的活性复合物,两个小亚基单位在中间,两个大亚基单位在外周,每个异二聚体包含一个催化位点^[1-2]。在各种 Caspase 酶原之间,大小亚基的同源性较高,而 N 端前域的同源性较低,因而 N 端前域成为区别 Caspase 家族各成员的重要指标。目前已发现该家族中有 16 个成员,其中第 11、12、14 来源于鼠科动物^[3]。由于 Caspase 本身可以自我活化并相互激活,因此凋亡过程一旦触发,即呈现级联放大效应。根据 Caspase 在级联反应上下游的位置及功能的不同可将 Caspase 家族大致分为两种类型: I 型 Caspase, 又称为启动型 Caspase (Initiator Caspase), 包括 Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10

等,位于 Caspase 级联反应的最上游,能在其他蛋白辅助因子的参与下发生自我活化并激活下游的 Caspase; II 型 Caspase, 又称为执行型 Caspase (Executioner Caspase), 包括 Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7 等,其作用在于特异性地裂解底物使细胞发生生化及形态学改变,最终导致细胞凋亡。除此之外,还有一类 Caspase 包括 Caspase-1、Caspase-4、Caspase-5、Caspase-13、Caspase-14 等,主要参与细胞因子介导的炎症反应并在死亡受体介导的细胞凋亡途径中起辅助作用^[4]。

2 Caspase 酶原的激活

Caspase 酶原本身没有水解活性,必须通过酶原的活化才能导致细胞凋亡。因此 Caspase 酶原的活化是引起细胞凋亡调控过程的中心环节。最新研究表明在 Caspase 的级联反应过程中,上游的启动型 Caspase 和下游的执行型 Caspase 有着明显不同的活化机制^[5]。启动型 Caspase 以单体酶原的形式存在,必须通过形成二聚体才能产生活性。而执行型 Caspase 的前体酶原就是以二聚体的形式存在,它通常需要上游 Caspase 蛋白酶或其它蛋白酶的水解激活。

2.1 启动型 Caspase 的活化

启动型 Caspase 酶原以非活性的单体形式存在于细胞内,在细胞凋亡信号的作用下, Caspase 通过 N 端募集结构域募集 Caspase 酶原形成多蛋白激活复合物,使得 Caspase 酶原局部浓度升高,水解活性增强从而完成自我活化。而这一活化复合物的形成依赖于凋亡信号刺激的发生,根据凋亡信号刺激途径的不同可将启动型 Caspase 的活化方式分为外源性激活途径 (Extrinsic pathway) 和内源性激活途径 (Intrinsic pathway)^[6],这两种激活途径最终都要通过执行型 Caspase 的活化来完成凋亡的发生。

作者简介: 王筱冰, (1981-), 女, 硕士研究生, 从事动物细胞学研究。E-mail: w_xiaobing@stu.snnu.edu.cn

(收稿日期: 2006-03-09 接受日期: 2006-04-01)

2.1.1 外源性激活途径(以 Caspase-8, Caspase-10 为例)

外源性激活途径即为死亡受体介导的凋亡通路。该通路在发育、免疫系统以及免疫系统介导的肿瘤切除等方面是相当重要的。死亡受体属于 TNF 超家族的成员,位于细胞膜表面,为 I 型跨膜蛋白,包括细胞外的半胱氨酸富集区和胞膜内的死亡结构域(Death domain, DD)。死亡结构域用于接受死亡信号和募集衔接子蛋白,其中衔接子蛋白这此起中间桥梁的作用,一方面衔接子蛋白通过其死亡结构域与死亡受体的死亡结构域相结合;另一方面,衔接子蛋白通过其氨基端的死亡效应结构域(Death effect domain, DED)与 Caspase 原域中的死亡效应区相结合,于是形成了由受体、衔接子和 Caspase 酶原构成的复合体。在此过程中, Caspase 酶原局部区域浓度上升,相邻的 Caspase 可以形成二聚化,水解活性增强,从而完成 Caspase 酶原本身的自我活化,继而诱发细胞凋亡。在死亡受体通路中, Fas(也称 CD95)介导的凋亡通路最为典型^[6,7]。3 个 Fas 受体与一个 Fas 三聚体配体结合后, Fas 通过其胞内的死亡结构域与其衔接子蛋白 FADD(Fas associated protein with death domain)羧基端的死亡结构域相互作用,募集细胞中的 FADD,同时 FADD 的死亡效应结构域与 Caspase-8 酶原中的死亡效应结构域相互作用,从而募集细胞中的 Caspase-8 酶原形成由 Fas、FADD 和 Caspase-8 构成的死亡诱导信号复合体(Death-inducing signing complex, DISC)^[8]。在 DISC 中, Caspase-8 通过蛋白质与蛋白质之间的相互作用形成二聚体,两个二聚体分子可以相互识别,相互作用,互为底物进行交叉切割反应。并且切割反应有一定的顺序,首先大小亚基之间的连接区被切割从而改变了大亚基与 N 端序列的构型,当大亚基与 N 端前域之间的连接区被切除,成熟的活性 Caspase-8 四聚体就释放到细胞质,然后作用于效应型 Caspase,引发 Caspase 级联反应。研究表明, Caspase-8 几乎能激活所有凋亡级联反应下游的 Caspase。

Caspase-10 也是死亡受体介导细胞凋亡的一个启动者, Caspase-10 的激活途径与 Caspase-8 相似,但 Caspase-10 是否可以功能性替代 Caspase-8 至今仍存在争议。实验发现,在 Caspase-8 缺陷的 *lurka1* 细胞系中发现 Caspase-8 是死亡受体介导凋亡所必须的,同时这一细胞系中的 Caspase-10 水平也下降了^[9,10]。但若用足量的 Caspase-10 来转染这些细胞,又发现这一细胞系又对死亡受体介导的细胞死亡途径相当敏感^[11]。若重组死亡受体 DR4 和 Caspase-10 同时对细胞进行转染,该细胞系又对死亡受体介导的细胞死亡途径不敏感^[12]。总之, Caspase-8 和 Caspase-10 尽管有很多相似之处,但它们在特殊的死亡受体介导的细胞凋亡途径中起不同的作用。

FLIP(Caspase 抑制蛋白)与 Caspase-8 序列相似,但缺乏 Caspase-8 的半胱氨酸残基接触反应位点。FLIP 能与 Caspase-8 一起竞争性地结合辅助因子 FADD,阻止 Caspase 的激活。Chang^[13,14]及其同事的工作表明:高浓度的 FLIP 抑制 Caspase-8 的活化;而低浓度时则可以与 Caspase-8 形成异二聚体,促进 Caspase-8 的活化,这也进一步确定了 Caspase-8 必须是首先形成二聚体的活化机制。

2.1.2 内源性激活途径(以 Caspase-9, Caspase-2 为例)

内源性激活途径也就是线粒体介导的凋亡途径,该通路在生物体应答于电离辐射、化疗药物、DNA 损伤、线粒体破坏以及发育阶段的死亡信号刺激等方面是非常重要的。细胞色素 c 存在于细胞线粒体内膜上,除了参与电子传递外,在细胞凋亡中也起着非常重要的作用。线粒体外膜上存在 MPT 孔,

该孔由膜外在蛋白(如 ANT)和膜内在蛋白(如电压依赖通道,VDAC)组成。当通道开放时,分子量 ≤ 1.5 KD 的分子能自由通过^[15]。当细胞内 Ca^{2+} 浓度过高,凋亡蛋白 Bax、氧化剂以及神经酰胺等物质刺激线粒体外膜 MPT 受体时, MPT 孔其将长期处于开放状态,水和溶质进入线粒体基质中,渗透压的不平衡引起基质肿胀外膜破裂,释放细胞色素 c、凋亡诱导因子等。细胞色素 c 从线粒体内膜释放到胞质中另一条途径是膜通道的开放并不伴随细胞器的膨胀^[16]。进入胞液的细胞色素 c 在 ATP 存在的情况下与凋亡蛋白酶活化因子(Apaf-1)的 WD40 结构域结合, Apaf-1 氨基端的 Caspase 激活募集结构域(CARD)与 Caspase-9 酶原 N 端原域中的 CARD 通过蛋白与蛋白之间的相互作用,以 1:1 的比例募集胞质中的 Caspase-9 酶原。Apaf-1 能与 ATP 结合,并且使其水解,所释放的水解产物和细胞色素 c 可共同促进 Apaf-1 的聚合,从而形成一个可以激活 Caspase-9 酶原的活性复合体^[17]。与 Caspase-8 相似,当 Caspase-9 酶原被募集在一起时,由于局部浓度的升高,水解活性上升,从而自我活化。活化的 Caspase-9 又可激活下游的 Caspase-3, Caspase-7 等,启动 Caspase 级联反应,诱导细胞凋亡。

三维结构表明 Caspase-9 的活性四聚体只有一个活性位点,这可能与二聚体表面的原子空间排布及碰撞有关^[15]。Caspase-2 与 Caspase-9 类似, Caspase-2 对于细胞应答于 DNA 的损伤是必须的,但其活化并不需要 Apaf-1 的参与。

2.2 执行型 Caspase 的活化(以 Caspase-7, Caspase-3 为例)

与启动型 Caspase 完全不同,执行型 Caspase 以非活性的二聚体酶原作为前体存在于细胞中^[18,19]。执行型 Caspase 包括 Caspase-3, Caspase-7 和 Caspase-6。它们可以在特定的环境下由启动型 Caspase 或偶尔由其它蛋白酶在分子内部连接区特异性切割而激活。Caspase-6 不如 Caspase-3、Caspase-7 那样被广泛研究,但因其缺乏相对较长的 N 端序列通常也被化分为执行型 Caspase。在执行型 Caspase 中, Caspase-7、Caspase-3 有 54% 相同的序列,两种 Caspase 具有高度相同的结构和功能^[20]。Caspase-7 酶原包含 303 个氨基酸,有两个接触反应位点。Caspase-7 酶原由启动型 Caspase 通过其分子内部连接区的天门冬氨酸残基处的切割才能激活。有文献报道 Caspase-7 的活化机制与 Caspase-9 有一定的相似性^[18,21],只是激活的方式不同。因为 Caspase-7 以二聚体酶原形式存在。其活性位点的活性被空间阻碍,直到分子内部连接区被其它蛋白酶水解切割才显示其活性。而 Caspase-9 以单聚体酶原形式存在,只有发生二聚化之后才允许活性位点在相邻二聚体上重新定位引发 Caspase 的激活。

至于执行型 Caspase 酶原是二聚体,而上游启动型 Caspase 酶原在通常情况下是单聚体,可能与它们的疏水性有关。Caspase-8、Caspase-9 的二聚体表面疏水性弱, Caspase-3、Caspase-7 二聚体表面的有较高的疏水特性。另外执行型 Caspase-3、Caspase-7 与启动型 Caspase 相比有较短的 N 端前导序列,对于其活化效应也起着非常重要的作用。

3 结论

Caspase 的活化在细胞凋亡调控中起核心作用,位于 Caspase 级联反应上下游的启动型 Caspase 和执行型 Caspase 表现出不同类型的活化机制。随着生化、结构分析以及细胞生物学的协同发展,大大加速了 Caspase 的研究进展,同时也揭示了 Caspase 活化的一个共同的功能性机制。尽管启动型 Caspase 和执行型 Caspase 有不同的活化机制,但二者酶原的功能

性机制是一致的。激活这两种类型的 Caspase 均需要由相邻二聚体共同构成的一个活性环的重新定位。启动型 Caspase 必须首先发生二聚化才允许其活性位点与临近单体相互作用,进而通过双方活性位点形成活性环定位二聚体表面来活化 Caspase。对于执行型 Caspase 来说,活性位点的重定位被二聚体内部连接区进行空间性的阻挡,只有当连接区肽段的水解切割反应发生之后才能使活性环重新定位于二聚体来活化执行型 Caspase。由此可见,切割反应对于执行型 Caspase 的活化也是有效的。

对于启动型 Caspase 的两条通路来说,外部通路的 Caspase-8 介导死亡受体传递的凋亡信号,内部通路的 Caspase-9 参与基因毒试剂诱导的死亡信号,二者的活化事件并非独立进行,它们是相互作用相互影响的。激活的 Caspase-8 能在胞浆中裂解 Bid,裂解产物的羧基端片段 tBid 转移到线粒体上,诱导线粒体释放细胞色素 c^[22,23]。从而使死亡受体通路与线粒体通路相联系起来,有效地放大了凋亡信号。它们共同引起启动型 Caspase 的活化,活化的 Caspase-8、Caspase-9 又可激活 Caspase-3 和 Caspase-7,继而启动 Caspase 级联反应,诱导细胞凋亡。

总之,Caspase 介导的细胞凋亡机制错综复杂,除以上两种主要途径外,还包含其它激活方式,各种途径之间并非严格独立,相互之间经常有交叉反应。除上游 Caspase 激活下游 Caspase 外,下游 Caspase 同样可激活上游 Caspase,它们之间也可以相互作用,如 Caspase-8 激活 Caspase-3 酶原,使之成为活化的 Caspase-3,而 Caspase-3 又能反过来作用于 Caspase-8 酶原,产生一个正反馈,使级联反应放大。

4 展望

Caspase 是蛋白水解酶家族,通常蛋白质的水解通路并不是蛋白水解本身,许多蛋白水解级联反应由辅助因子启动。辅助因子的参与造成蛋白质酶原构象的改变从而使酶原激活。启动型 Caspase 以低浓度的单聚体形式存在于细胞内,而协同因子能使 Caspase 前体发生聚集,从而使分子内的自身水解作用被激活。执行型 Caspase 前体在细胞中一某种构象或复合体的形式存在阻止了其蛋白水解,协同因子的参与直接改变了前体构象或除去复合物的抑制成分来激活 Caspase。从这一观点出发,执行型 Caspase 的活化机制应该还是比较进化的。并且在凋亡发生事件中,如果能越过启动型 Caspase 二聚化的能量障碍,就有可能将双分子之间的相互作用变成单分子之间的相互作用。一旦有蛋白质水解信号产生,就可利用特异性蛋白质的水解驱动 Caspase 瀑布式的级联反应。

细胞凋亡的分子生物学机制相当复杂,Caspase 是哺乳动物细胞凋亡过程中的关键环节^[24]。在癌症治疗中,常规方法如放疗、化疗等对正常细胞产生一定的损伤,但通过激活与 Caspase 起始因子相连的死亡受体复合物或直接激活 Caspase 则可以选择性诱导肿瘤细胞凋亡,降低对正常细胞的损伤。因此对 Caspase 作深入的研究,了解其结构、性质,尤其是具体通过何种途径被激活,如何加大级联效应导致肿瘤细胞凋亡,为肿瘤治疗研究有一定的意义。

参考文献

- [1] Chang HY et al. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. Microbiol J. Mol. Biol. Rev., 2000, 64: 821- 846
- [2] DW Nicholson. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11): 1028- 1042
- [3] 乔晓牧. Caspase 与细胞凋亡[J]. 沈阳教育学院学报, 2000, 2: 234 - 237
- [4] Tschopp J, Martinon F, Bums K: NALPs: a novel protein family involved in inflammation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4: 95- 104
- [5] Mechanisms of caspase activation Kelly M Boatright and Guy S Salvesen Current Opin in Cell[J]. Biology 2003, 15: 725- 731
- [6] Ashkenazi A, Dixit VM: Death receptors: signaling and modulation[J]. Science 1998, 281: 1305- 1308
- [7] Martin D A, Siegel R M, Zheng L X, et al. Membrane oligomerization and deavage activates the Caspase- 8(FLICE/MACH1) death signal[J]. J Bio chem., 1998, 273(8): 4345- 4349
- [8] Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X: Inter- dimer processing mechanism of procaspase- 8 activation[J]. EMBO J 2003, 22: 4132- 4142
- [9] Joo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J: Essential requirement for caspase- 8/ FLICE in the initiation of the Fas- induced apoptotic cascade[J]. Curr Biol 1998, 8: 1001- 1008
- [10] Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, et al A: Death receptor recruitment of endogenous caspase- 10 and apoptosis initiation in the absence of caspase- 8[J]. J Biol Chem 2001, 276: 46639- 46646
- [11] Wang J, Chun HJ, Wong W, et. al. Caspase- 10 is an initiator caspase in death receptor signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98: 13884- 13888
- [12] Sprick MR, Rieser E, Stahl H, et al. Caspase- 10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death- inducing signalling complexes in a FADD- dependent manner but can not functionally substitute caspase- 8[J]. EMBO J 2002, 21: 4520- 4530
- [13] Chang DW, Xing Z, Pan Y, et al. c- FLIP(L) is a dual function regulator for caspase- 8 activation and CD95- mediated apoptosis[J]. EMBO J 2002, 21: 3704- 3714
- [14] Micheau O, Thome M, Schneider P, et. al: The long form of FLIP is an activator of Caspase- 8 at the Fas death- inducing signaling complex [J]. J Biol Chem 2002, 277: 45162- 45171
- [15] Hirsch T, Susin SA, Marzo I, et al. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis[J]. Cell boil toxicol., 1998, 14(2): 141- 145
- [16] Bradham CA, Qian F, Street K, et al. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha mediated apoptosis and cytochrome C release[J]. Mol cell boil, 1998, 18(11): 6353- 6364
- [17] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. Science. 1998, 281(5381): 1309- 1312
- [18] Chai J, Wu Q, Shiozaki E, et al. Crystal structure of a procaspase- 7 zymogen. Mechanisms of activation and substrate binding[J]. Cell 2001, 107: 399- 407
- [19] Boatright KM, Renatus M, Scott FL, et al. A unified model for apical caspase activation[J]. Mol Cell 2003, 11: 529- 541
- [20] Fernandes- Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R. et al. a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32[J]. Cancer Res. 1995, 55: 6045- 6052
- [21] Stennicke HR, Deveraux QL, Hunke EW, et al. Caspase- 9 can be activated without proteolytic processing[J]. J Biol Chem 1999, 274: 8359- 8362
- [22] Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, et al. Insights into the regulatory mechanism for caspase- 8 activation. Mol Cell. 2003, 11: 543- 549
- [23] 朱愿, 马勇, 陈立军. Caspase 与细胞凋亡[J]. 武警医学院学报, 2004, 13(4): 346- 348
- [24] 刘伟, 李庆军. Caspase 与细胞凋亡[J]. 新乡医学院学报, 2005, 22(1): 67- 70