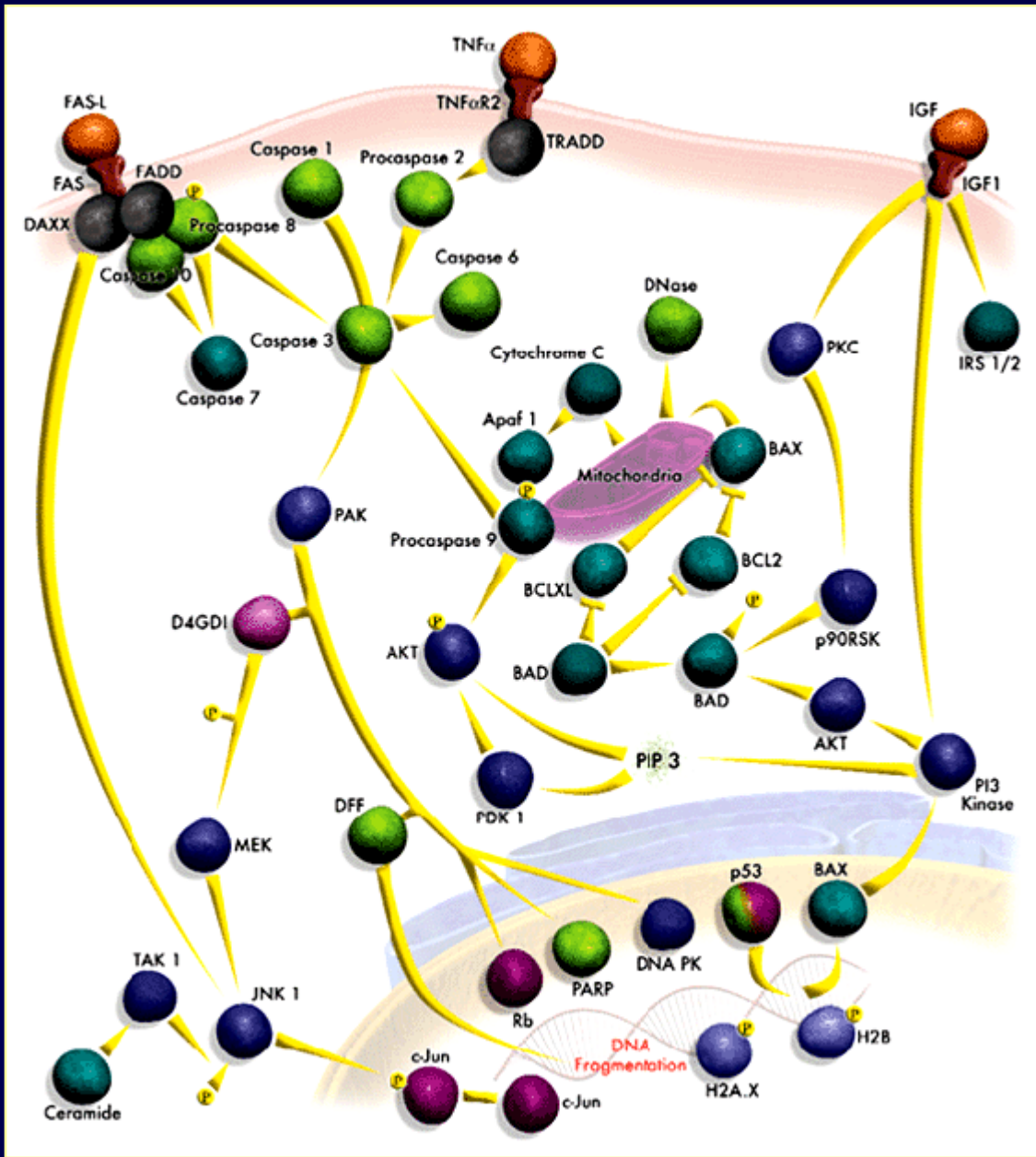
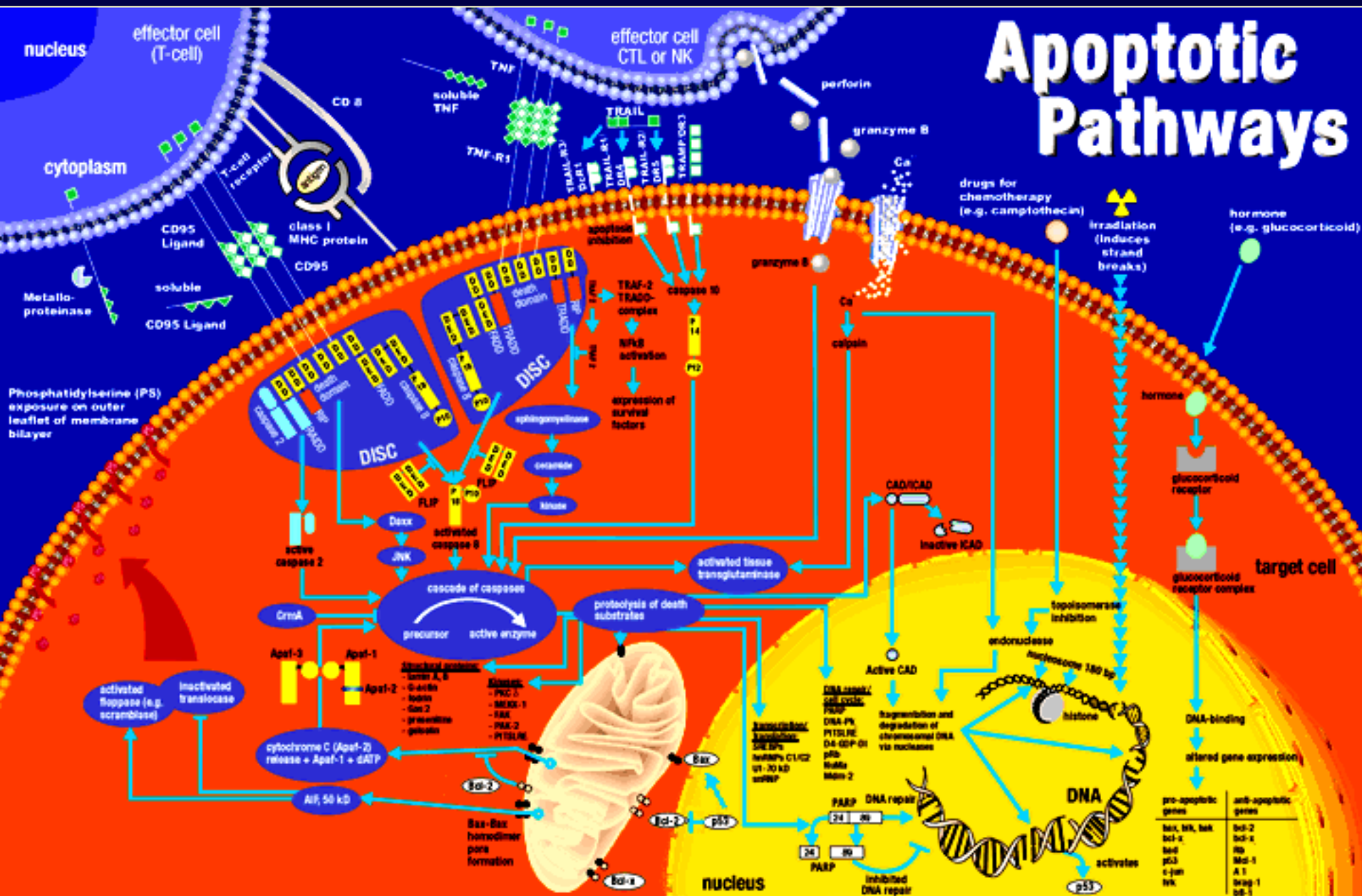
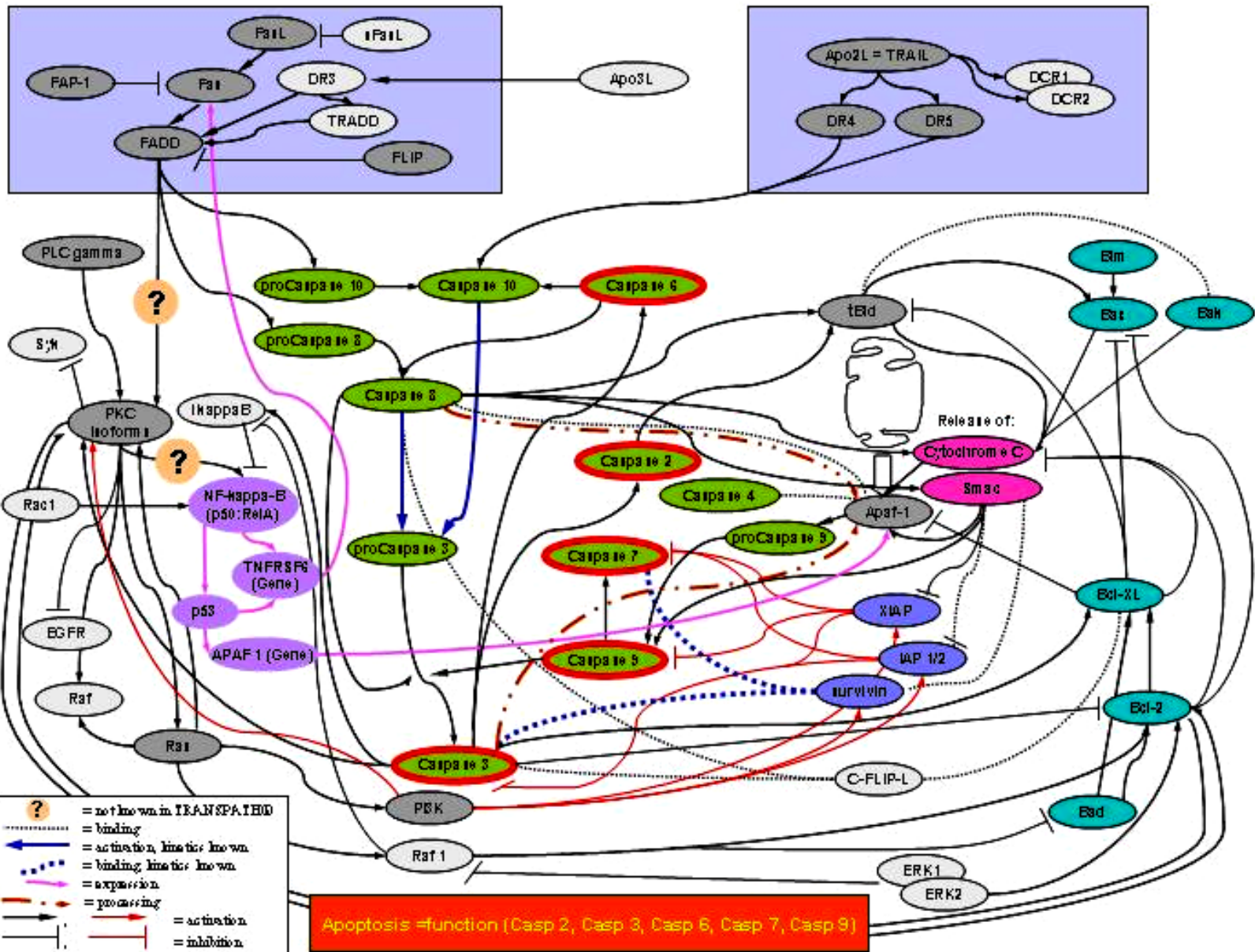


PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT



Apoptotic Pathways





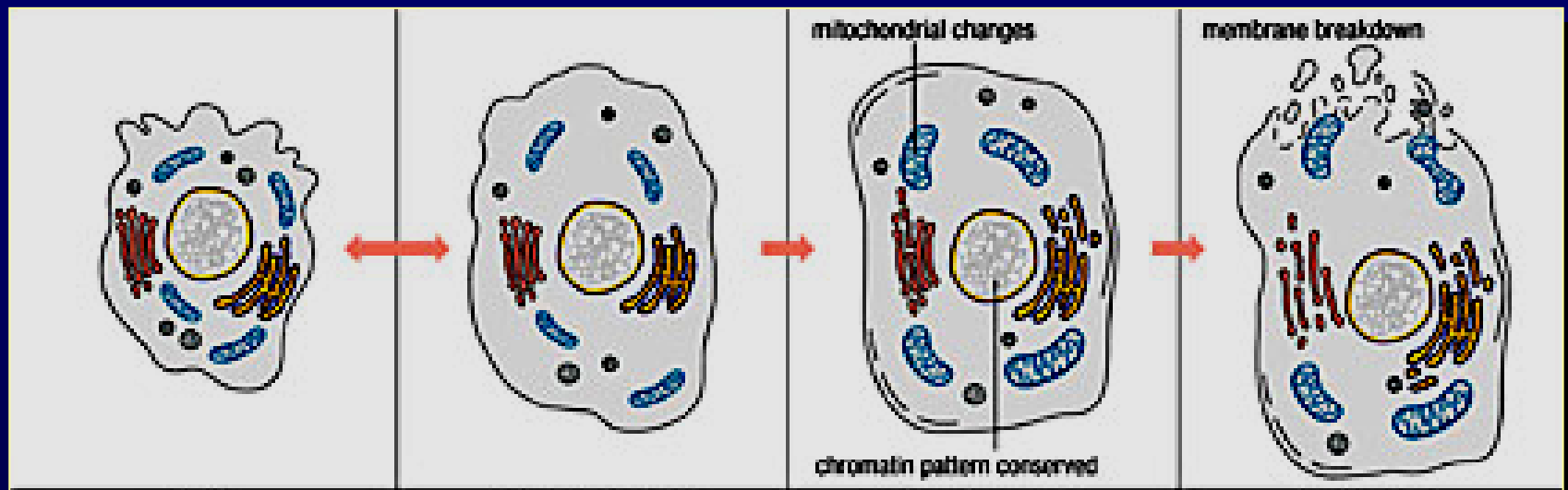
Způsoby buněčné smrti:

- smrt v důsledku působení škodlivého vnějšího faktoru
- smrt jako indukovaná sebevražda
- katastrofická buněčná smrt
- fyziologická buněčná smrt
- apoptóza, autofagie, nekróza, onkóza

NEPROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT:

nekróza

- katastrofická smrt buňky v důsledku vnějších vlivů
- příčinou ireverzibilní poškození některé ze základních buněčných funkcí



PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT (Programmed Cell Death, PCD)

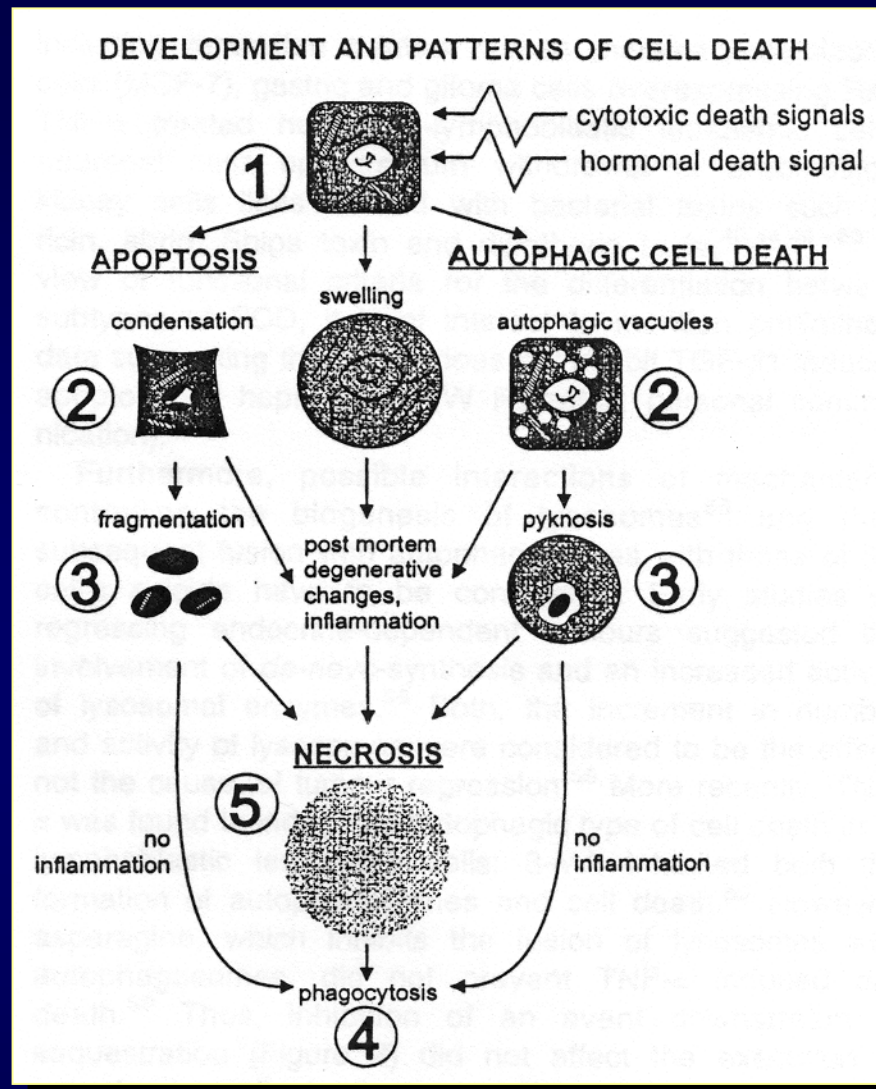
- indukovaný, regulovaný a selektivní proces pro vyřazování určitých buněk

Apoptóza (apoptosis, type I PCD)

- kaspázy, kalpainy, katepsiny, granzymy

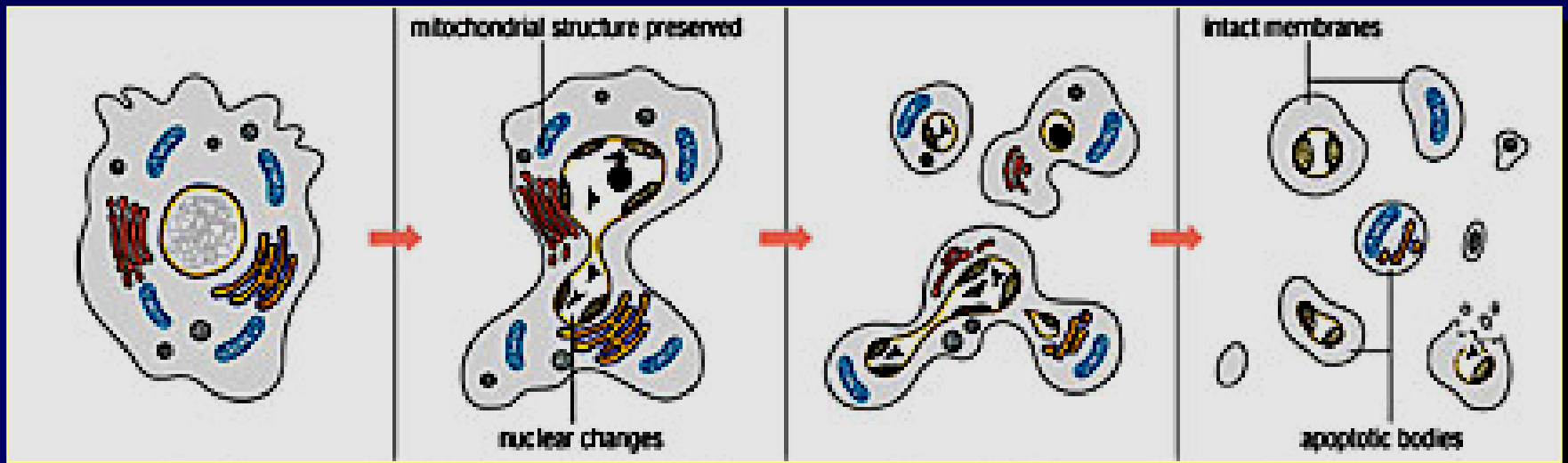
Autofagie (autophagy, type II PCD)

- autofagozomy/autolysozomy
(lysozomální proteázy)



Bursch, W. 2001 (Cell Death and Differentiation 8, 569-581)

Průběh apoptózy:



normální
buňka

smršťování

rozpad
(fragmentace)

apoptická
tělíska
(apo-bodies)

Proč buňky podléhají apoptóze?

1. Apoptóza je nezbytná pro řádný vývoj organismu:

- **resorpce ocásku během metamorfózy pulce v žábu**
- **odstranění tkáně mezi prsty během embryogeneze**
- **odstranění nadbytečných neuronů při vytváření synapsí v mozku**
- **uvolňování endometria na počátku menstruace**

Proč buňky podléhají apoptóze?

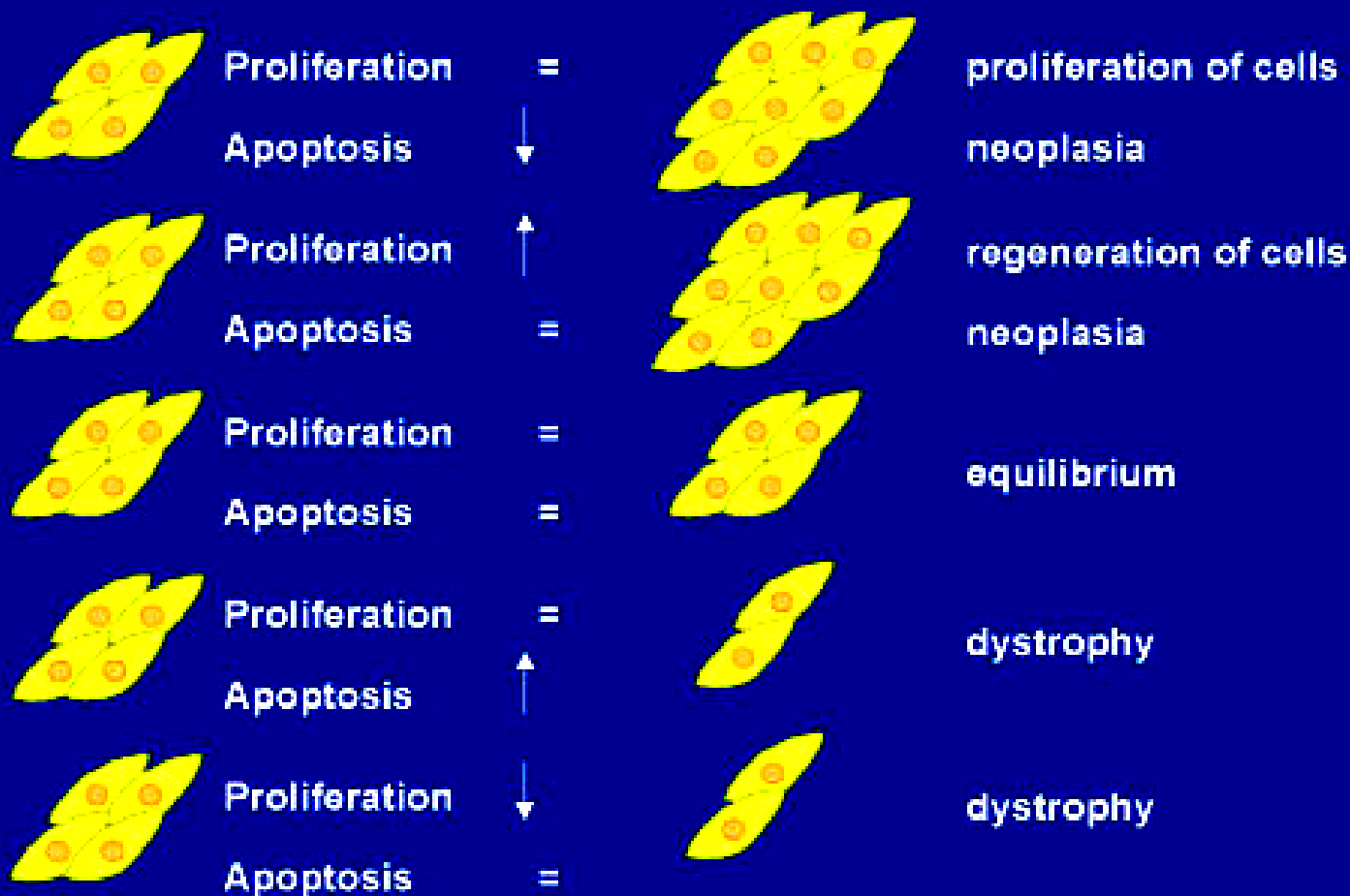
2. Apoptóza je nezbytná pro likvidaci buněk, které představují ohrožení integrity organismu

- **buňky infikované viry**
- **efektorové buňky imunitního systému po odeznění imunitní odpovědi**
- **buňky s poškozením DNA
zvýšená produkce proteinu p53
(induktor apoptózy)**
- **nádorově transformované buňky**

Morphology



Apoptosis and Cell Proliferation in Tissue Homeostasis



Jak se „rozhoduje“ o apoptóze?

Odstranění pozitivního signálu

- **růstové faktory - neurony**
- **Interleukin 2 (IL-2) - lymfocyty**

Přijetí negativního signálu

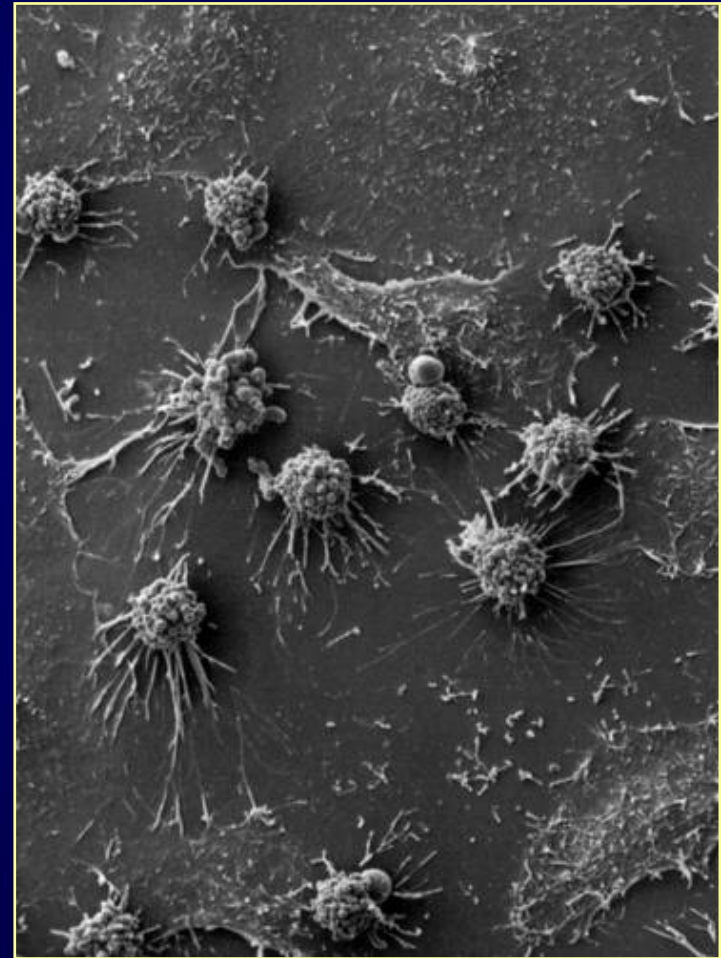
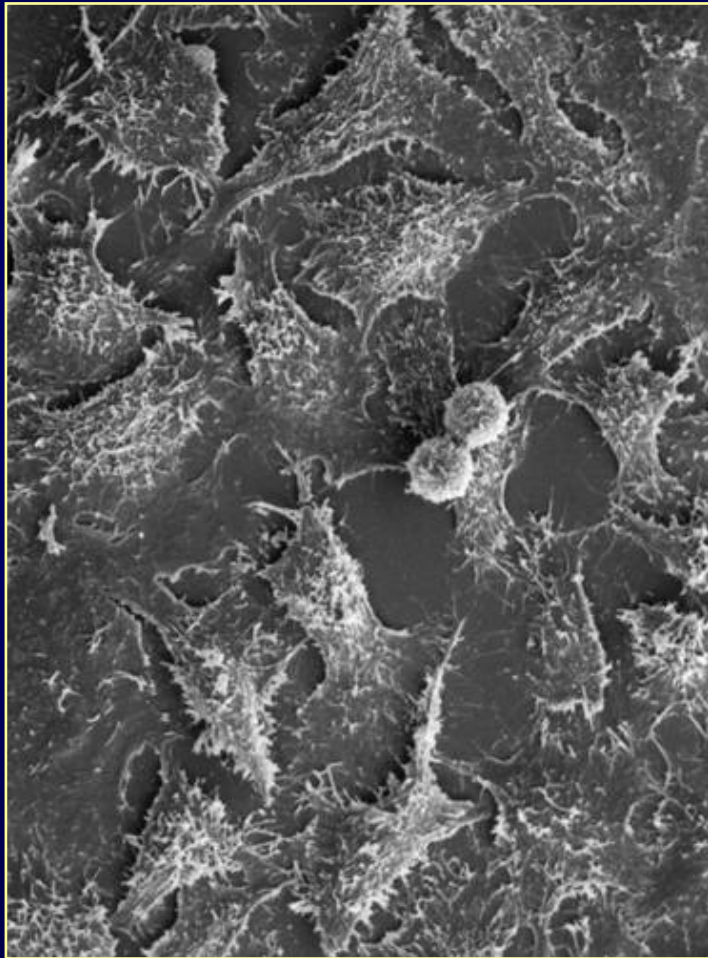
- **zvýšení hladiny oxidačních látek v buňce, ROS**
- **poškození DNA (volné radikály, UVR, gama záření, chemoterapeutika)**
- **molekuly (death ligands), které se napojují na specifické receptory (death receptors)**

MORFOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ PŘÍZNAKY APOPTÓZY

1. Zmenšení (smrštění) buňky
2. Porucha adherence
3. Poruchy permeability mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c
4. Blebbing plazmatické membrány
5. Změny v plazmatické membráně
6. Kolaps jádra (degradace chromatinu)
7. Zvýšená aktivita transglutaminázy
8. Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení
9. Rozpad buňky na apoptotická tělíska
10. Fagocytóza apoptotických tělísek

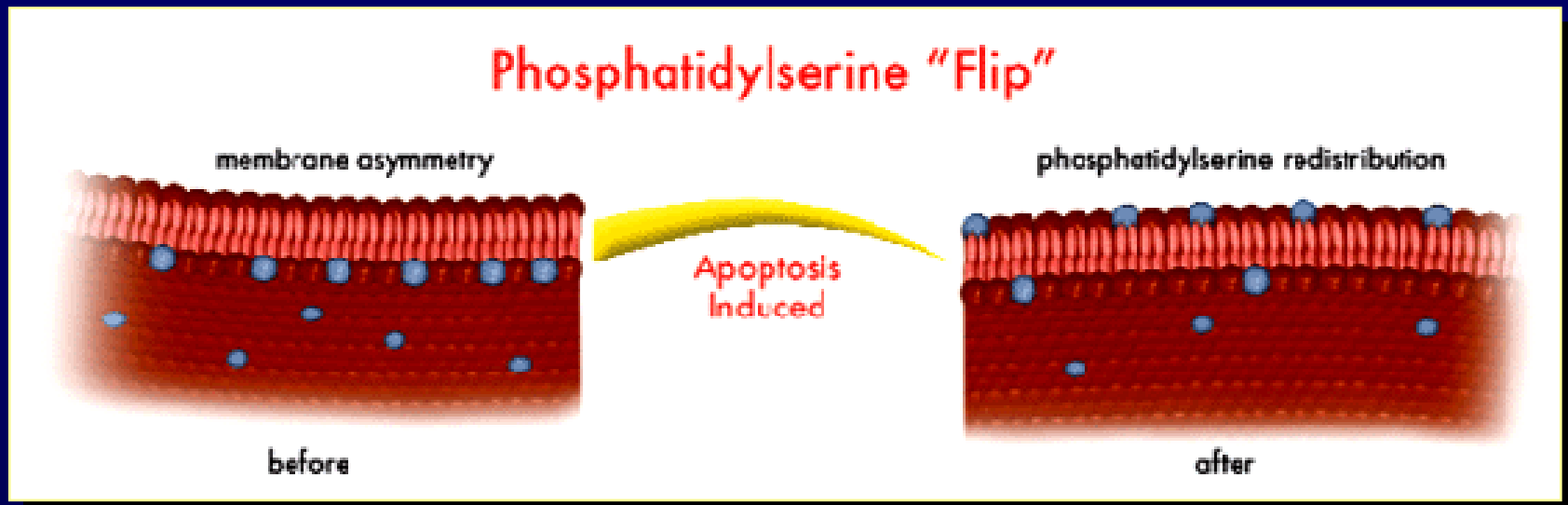
Poruchy adherence

- ztráta fokálních adhezí



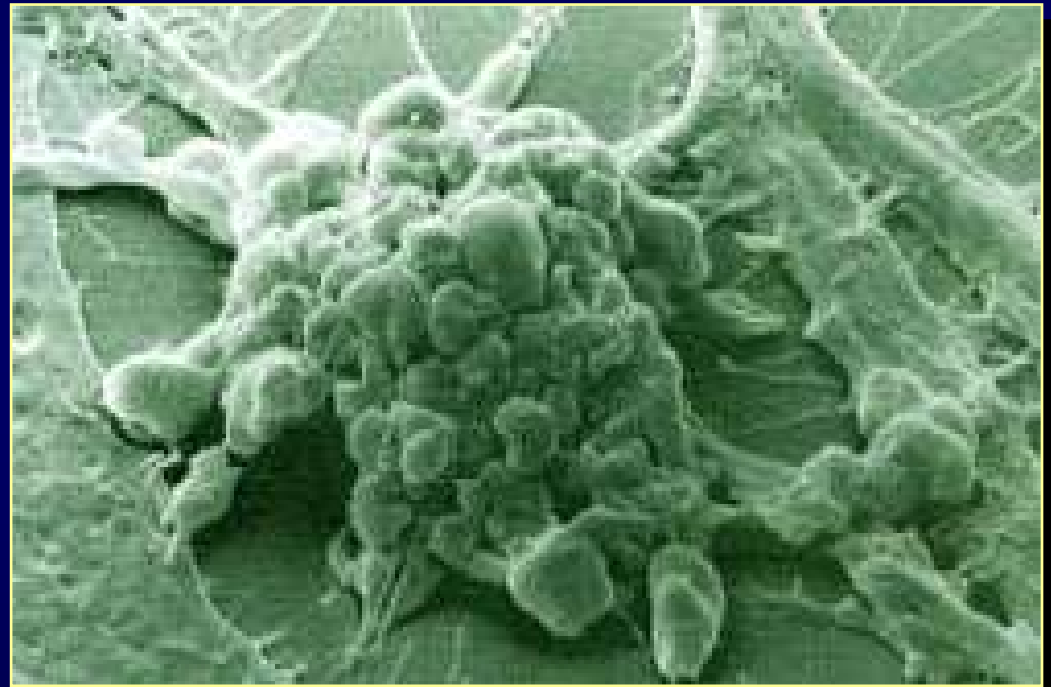
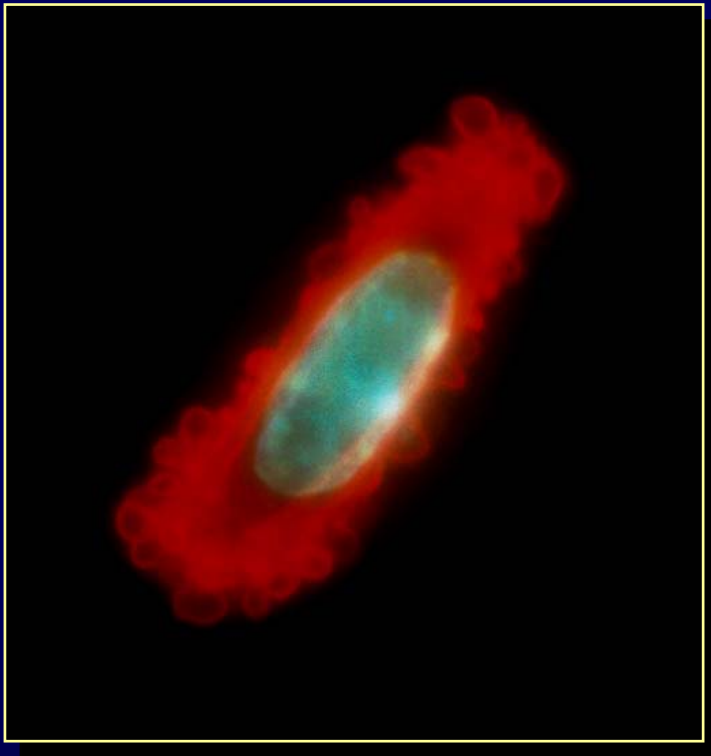
Změny v plazmatické membráně

- externalizace fosfatidylserinu („eat me“ signal)



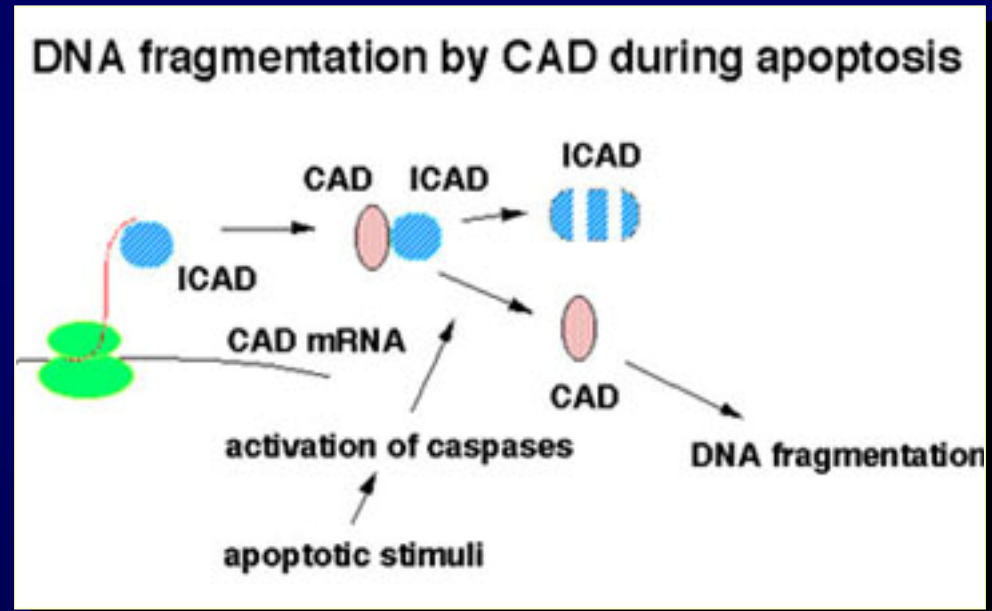
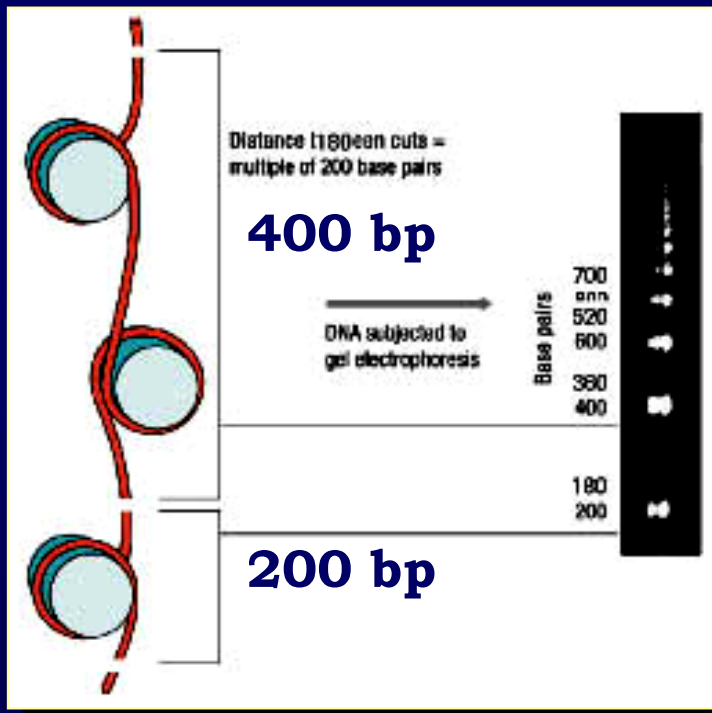
Blebbing plazmatické membrány

- degradace kortikálního cytoskeletu (fodrin, aktin)



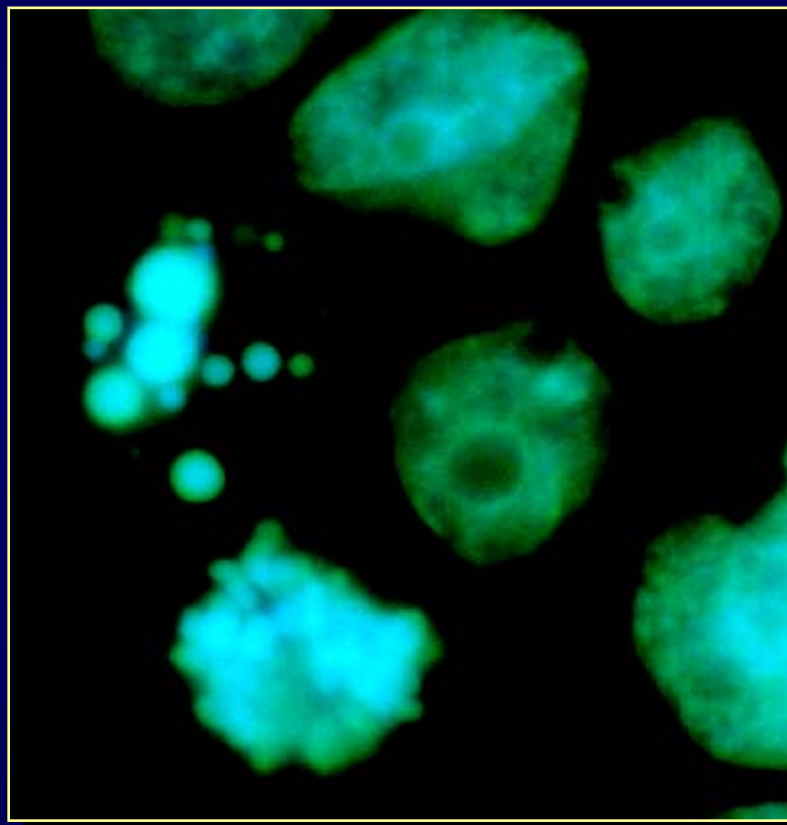
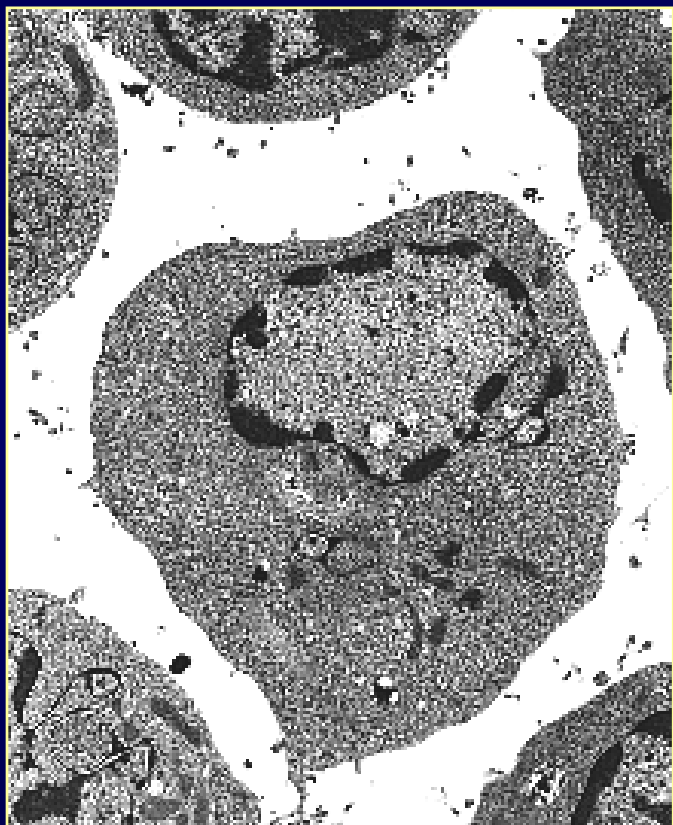
Kolaps jádra (degradace chromatinu)

- kondenzace chromatinu na periferních oblastech jádra, později i v celém obsahu jádra
- internukleosomální štěpení DNA - žebříček (ladder)
- fragmentace jádra



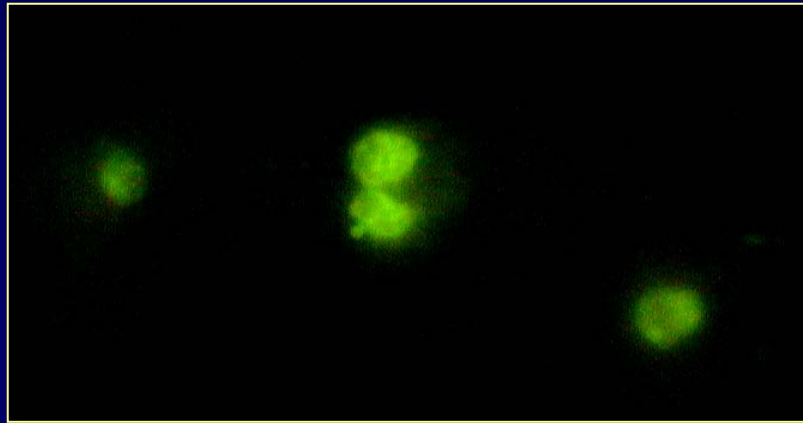
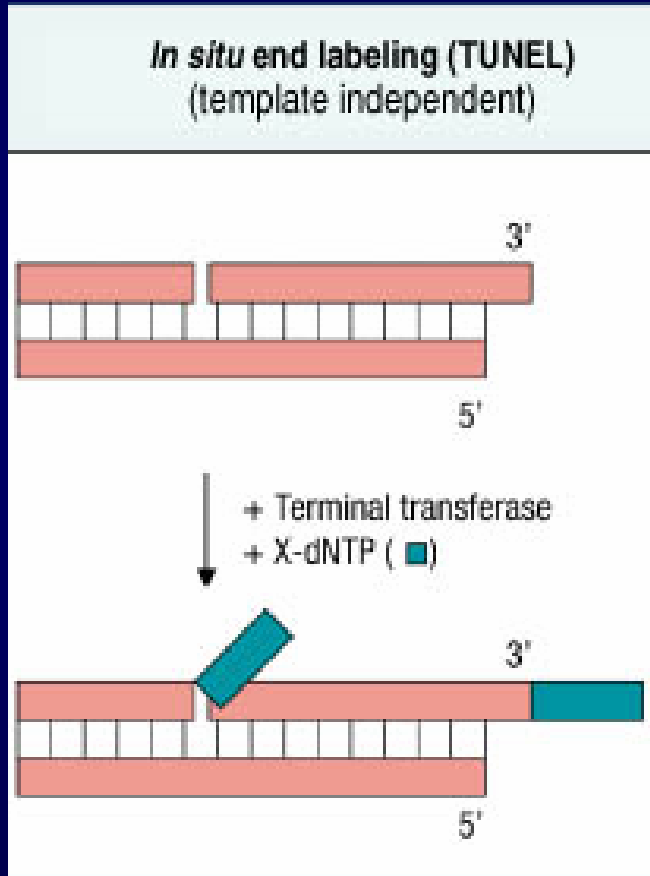
CAD – caspase-activated DNase

Kolaps jádra (degradace chromatinu)

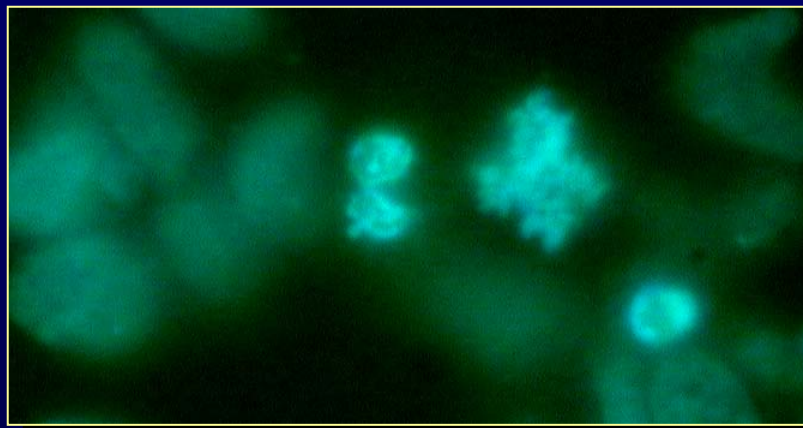


Detekce internukleosomálního štěpení DNA:

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labelling



TUNEL



DAPI

Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení

kaspázy

cysteinové proteázy, štěpící na karboxyskupině
kyseliny asparagové

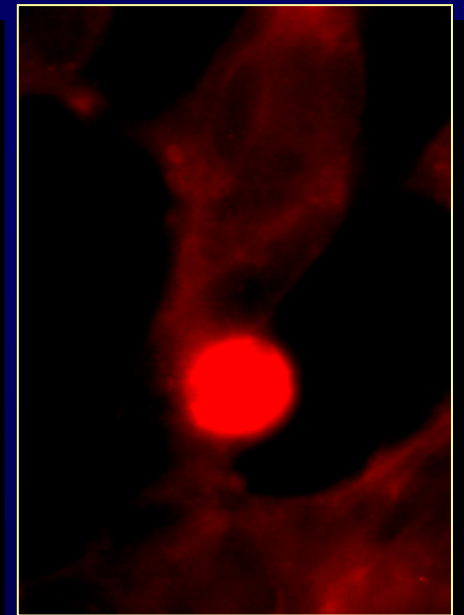
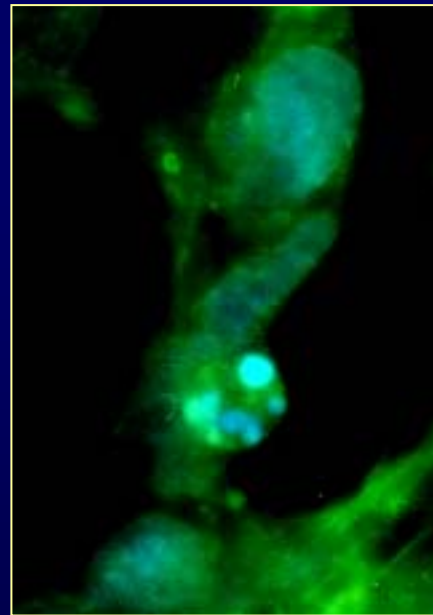
caspases = cysteinyl-aspartic-acid-proteases

14 druhů kaspáz:

iniciační (2, 8, 9 a 10)

efektorové (3, 6 a 7)

**inflamatorní (1, 4, 5,
11-14)**

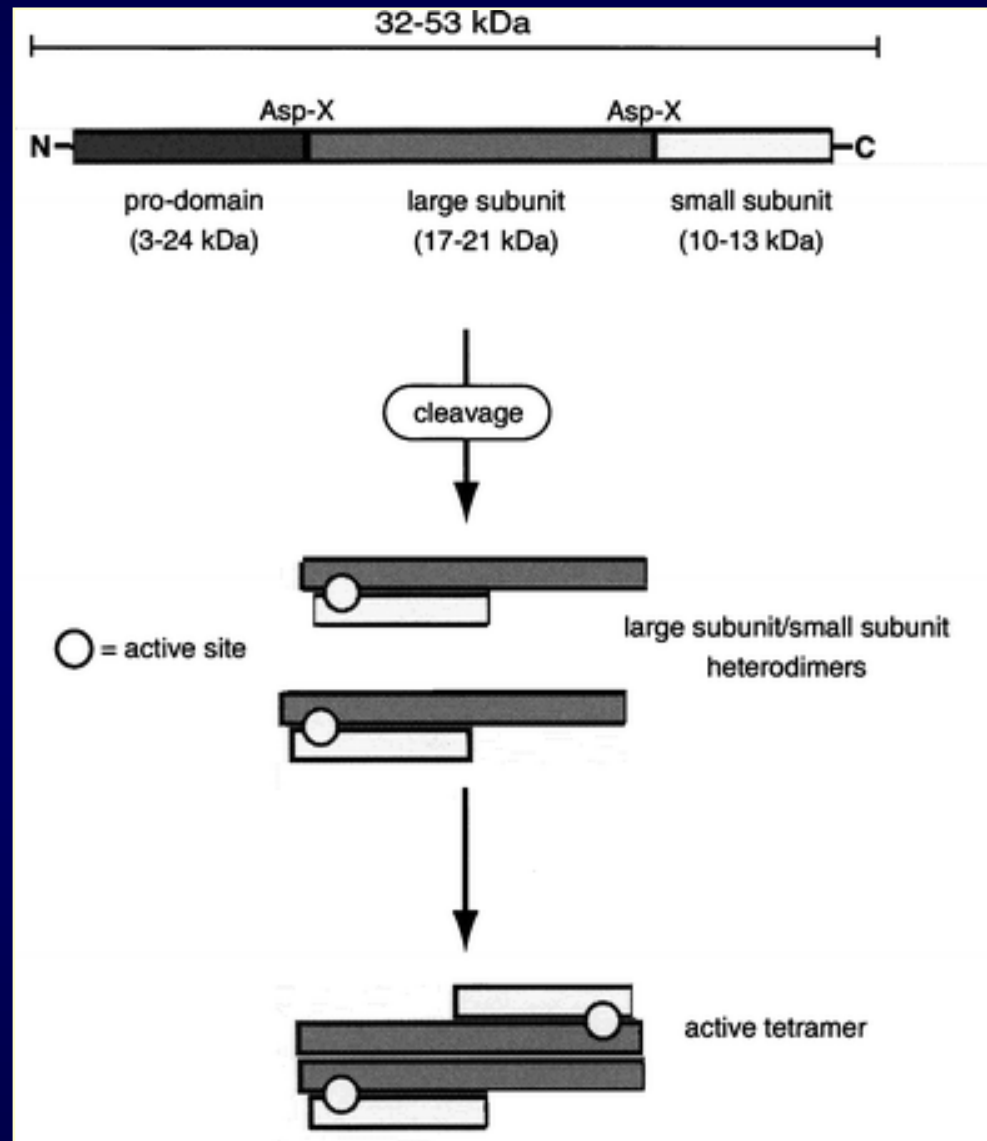


Aktivace kaspáz, proteolytické štěpení

prokaspáza

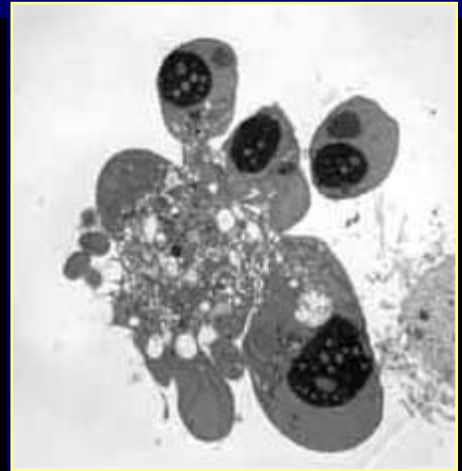
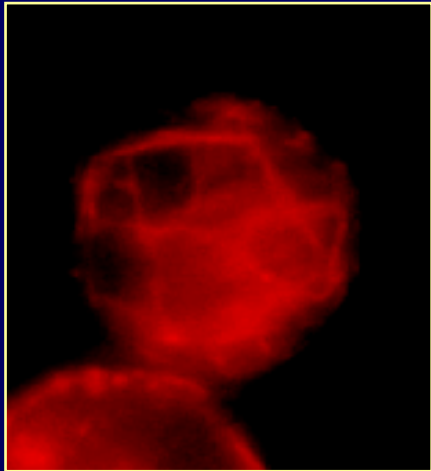
kaspáza

aktivní kaspáza



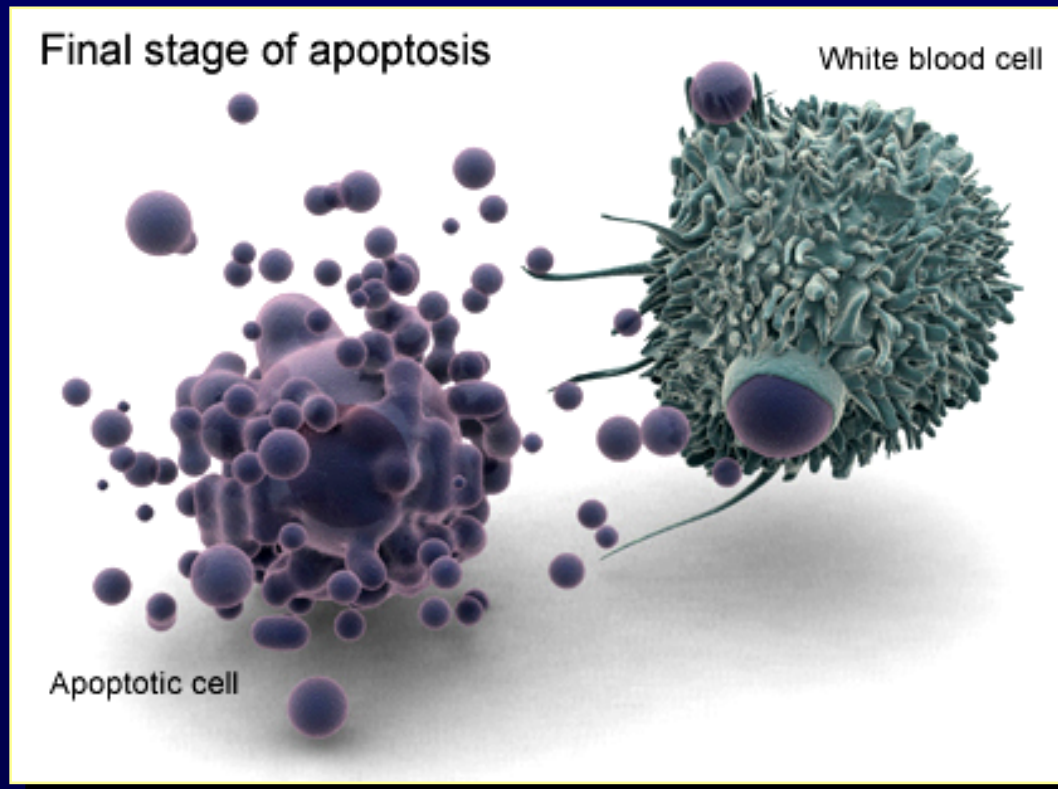
Rozpad buňky na apoptotická tělíška

- aktinový kontraktilní aparát

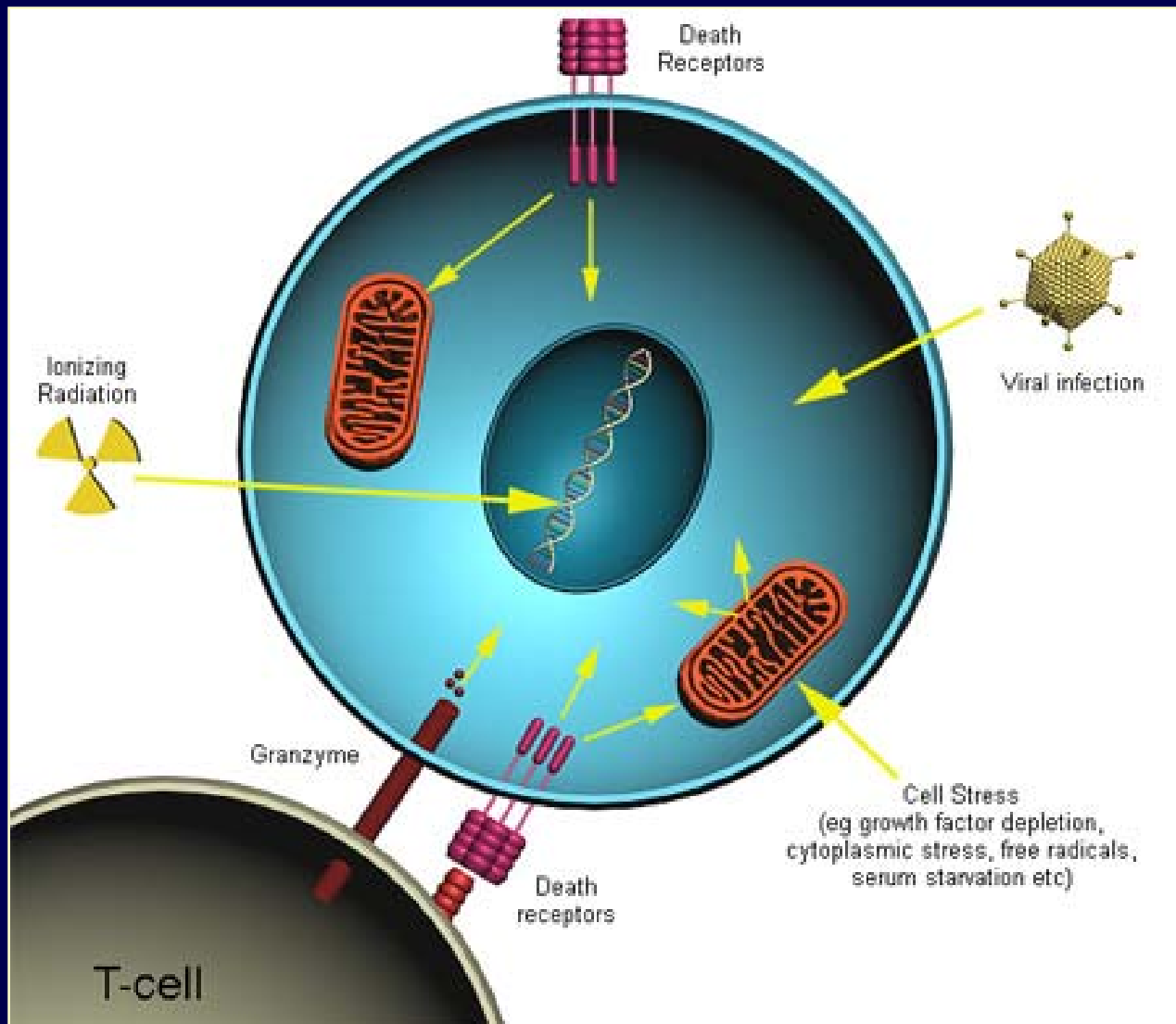


Fagocytóza apoptotických tělísek

- pohlcení apoptotických tělísek okolními buňkami (makrofágy, dendritické buňky)
- fagocytující buňky vylučují cytokiny, které zabraňují zánětu ve tkáni



Mechanismy indukce apoptózy



Mechanismy apoptózy

APOPTÓZA VYVOLANÁ VNITŘNÍMI SIGNÁLY:

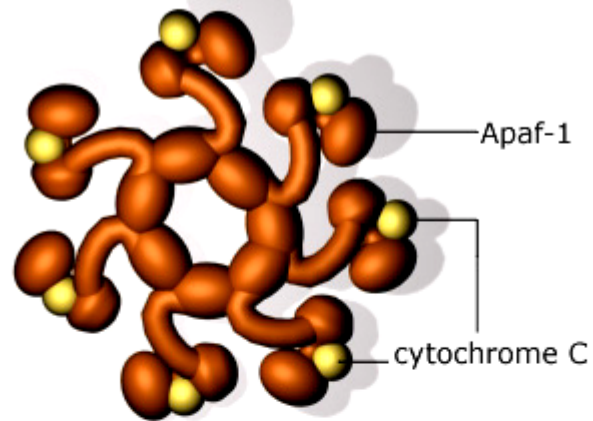
- zdravá buňka exprimuje na vnější membráně mitochondrií protein **Bcl-2**, vázaný k **Apaf-1**
- při poškození buňky protein **Bcl-2**:
 - uvolní **Apaf-1**
 - kanály se uvolní cytochrom C z mitochondriích

→ **apoptosom:** **Apaf-1**
Cytochrom C
prokaspáza 9
(dATP)

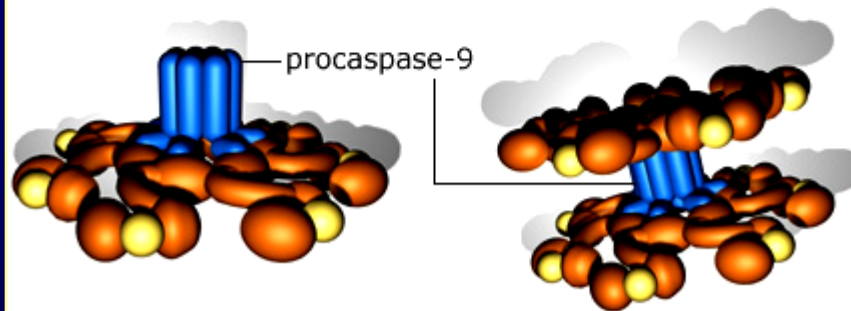
→ **aktivní kaspáza 9** (iniciační) - aktivuje prokaspázu 3

→ **aktivní kaspáza 3** (efektorová) - štěpí proteiny

First stage of apoptosome formation

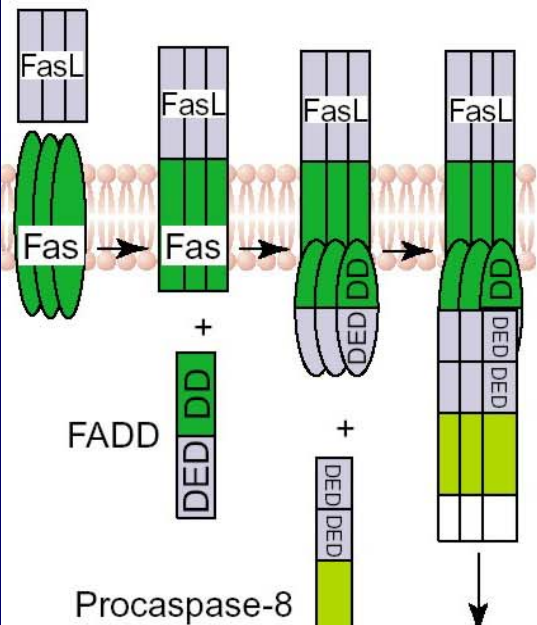


Recruitment of
procaspase-9

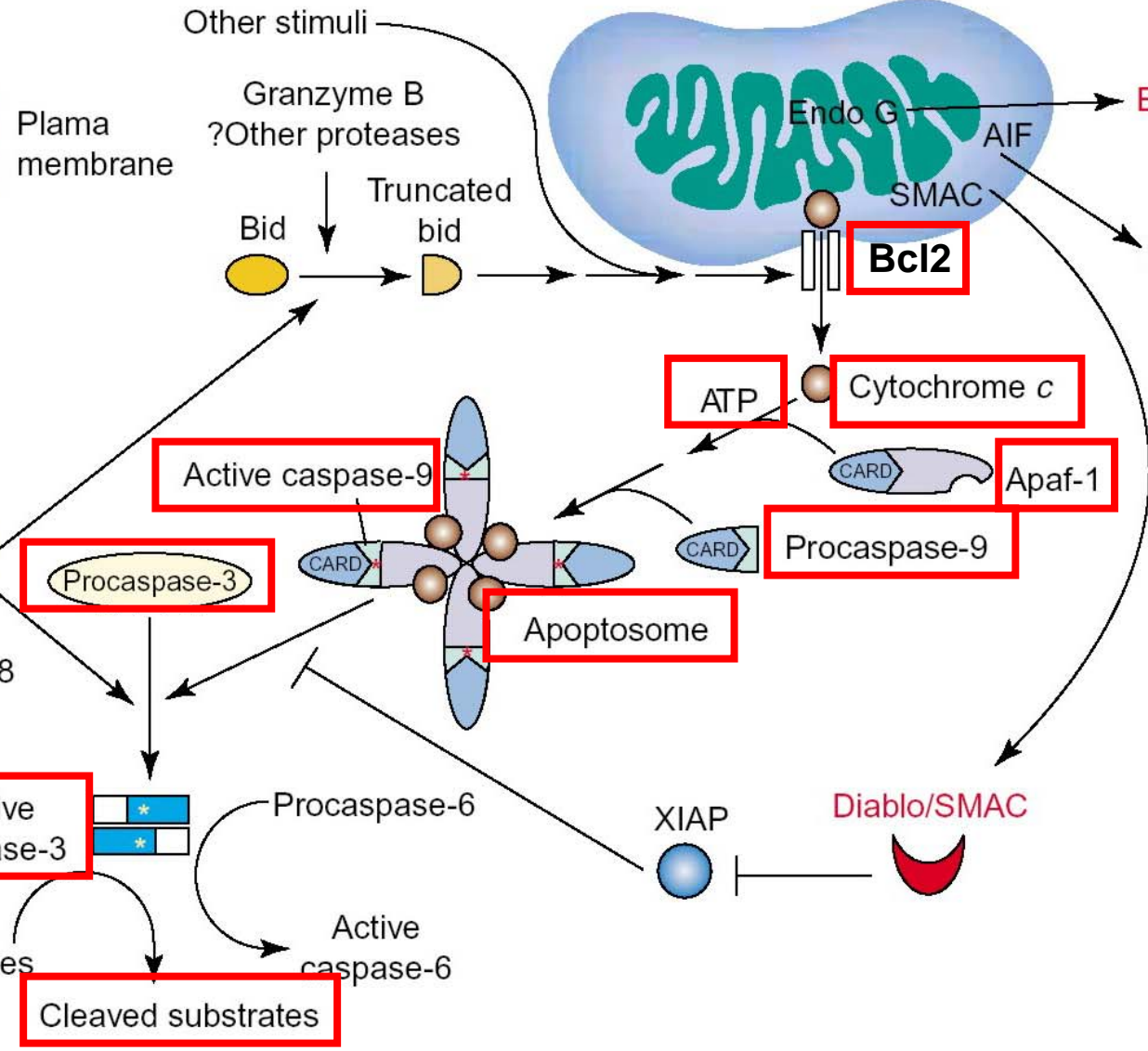


Caspase Activation

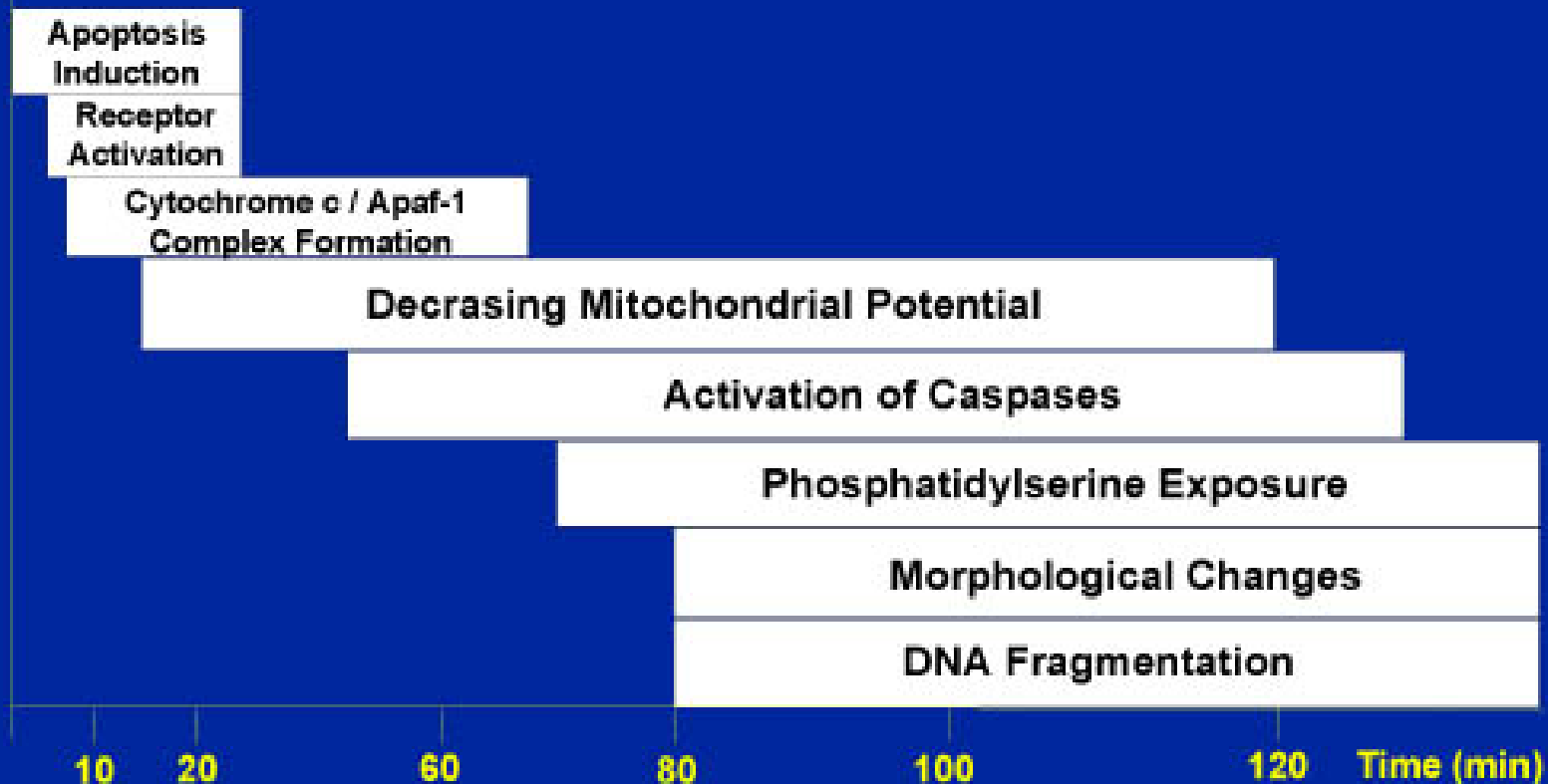
Death receptor pathway



Mitochondrial pathway



Hallmarks of Apoptosis



HeLa cells, apoptosis induction with TNF α / Actinomycin D

Mechanismy apoptózy

APOPTÓZA VYVOLANÁ VNĚJŠÍMI SIGNÁLY:

- indukce cytotoxickými T-lymfocyty (granzym B):
přímá aktivace kaspáz (3, 7, 8, 10)
- aktivační molekuly (death ligands) se napojují na specifické receptory v plazmatické membráně:

Tumor necrosis factor α (TNF- α) – TNF receptor

Lymphotoxin (TNF- β) – TNF receptor

Fas-ligand (FasL) – Fas receptor (CD95)

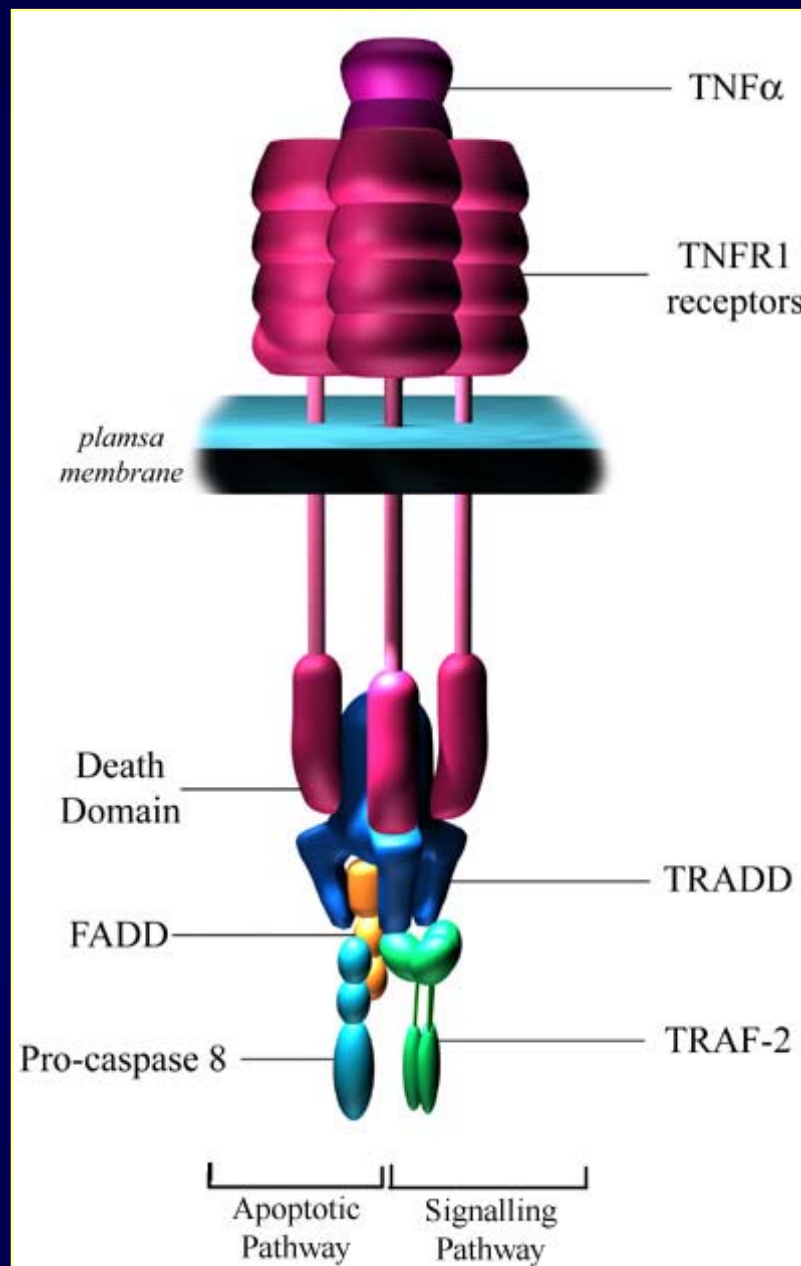
přenos signálu do cytoplasmy

přes adaptorové molekuly (TRADD, FADD)

aktivace prokaspázy 8

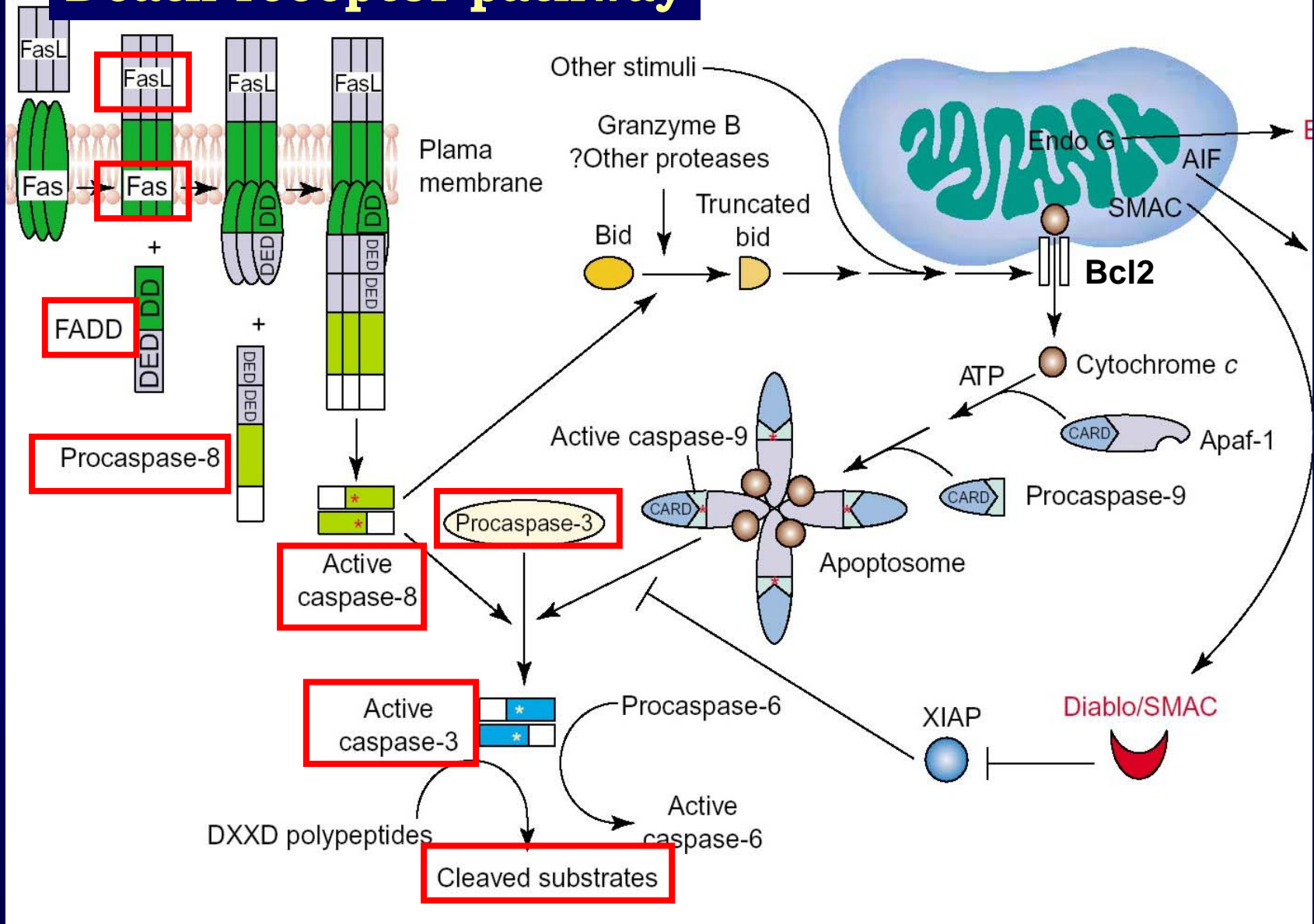
aktivovaná kaspáza 8 štěpením dalších prokaspáz

spouští proteolytickou kaskádu



Death receptor pathway

Mitochondrial pathway




AMERICAN
ASSOCIATION FOR THE
ADVANCEMENT OF
SCIENCE

SCIENCE

24 DECEMBER 1995
Vol. 262 • Pages 1943-2108

\$6.00



p53 Molecule of the Year

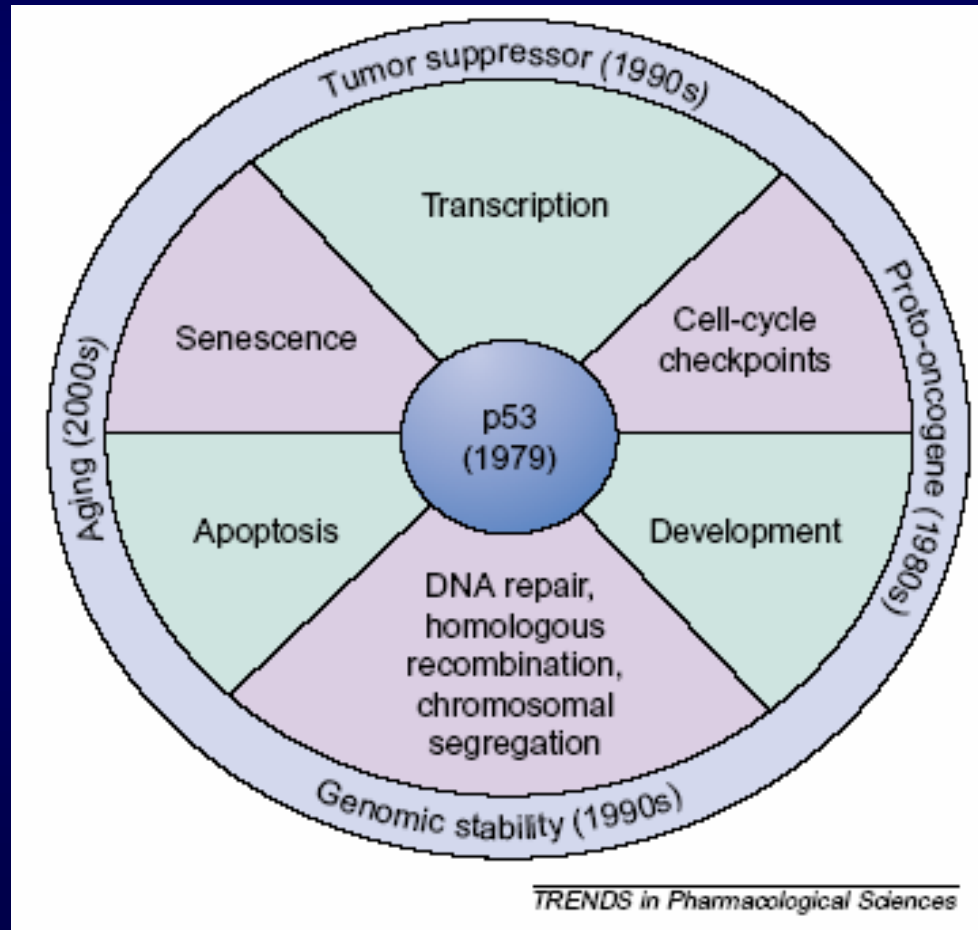
A Genetic Key to Cancer

„Some molecules are good guys, some are bad guys, and some become bad because they fail in their functions. The molecule p53 is a good guy when it is functioning correctly.“

**Editor-in-Chief:
Daniel E. Koshland Jr.**

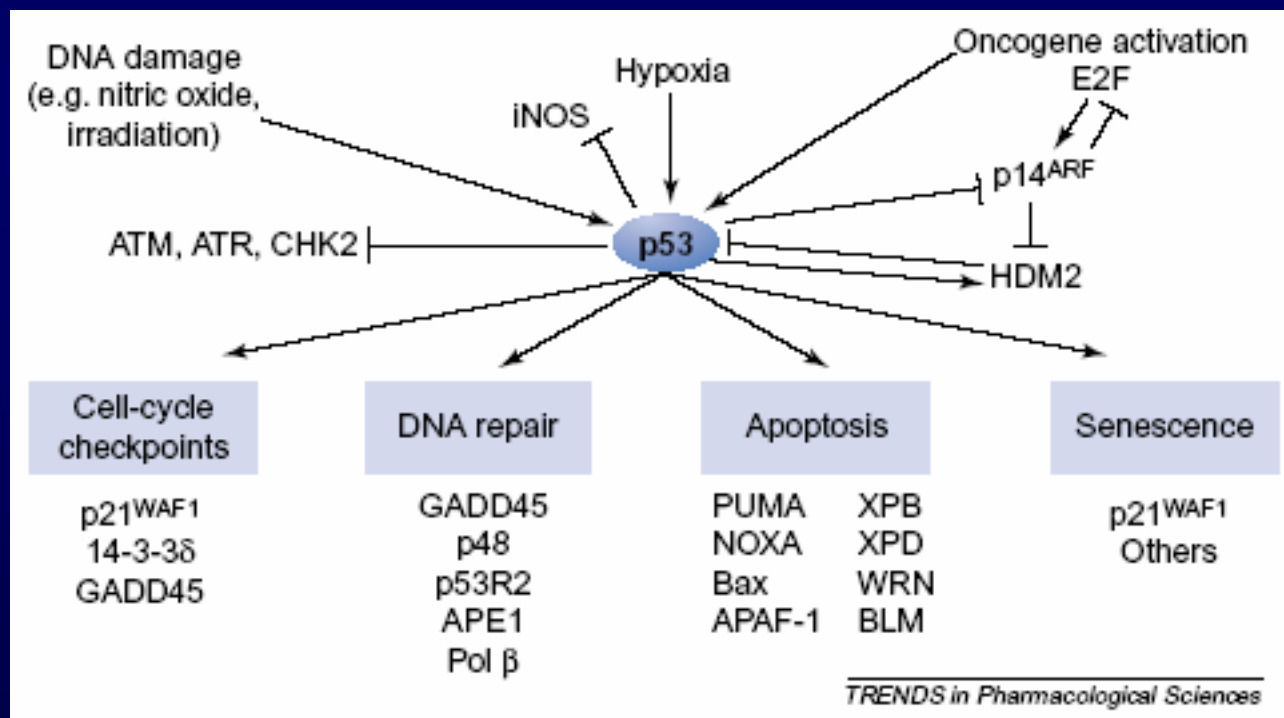
p53

objeven 1979 - původně protoonkogen (mutatní forma)
od 90. let – funkce tumorového supresoru, udržování
genomové stability („guardian of genome“), indukce
apoptózy



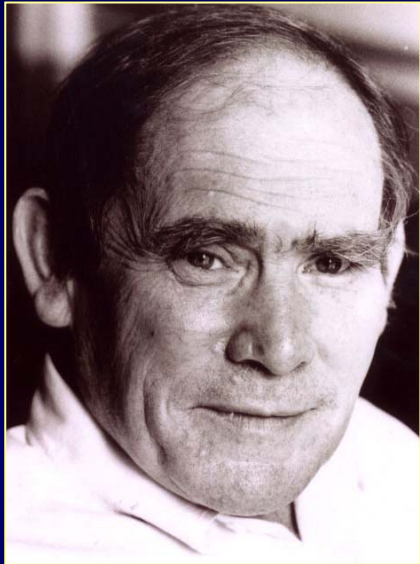
aktivace p53

- poruchou metabolismu způsobenou viry nebo poškozením DNA (záření, ROS aj.)
- buněčnou hypoxií
- nedostatkem ATP
- aktivací onkogenů

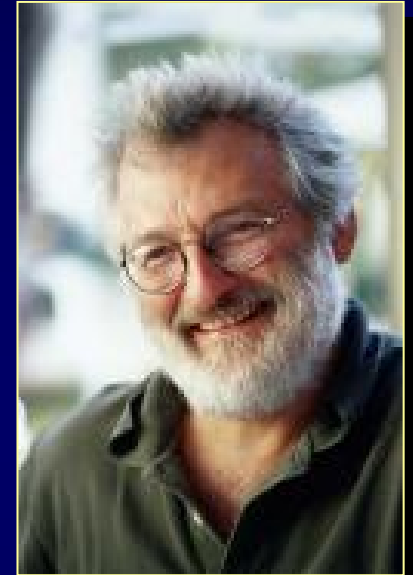


2002 - Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

Sydney Brenner



John E. Sulston



H. Robert Horvitz

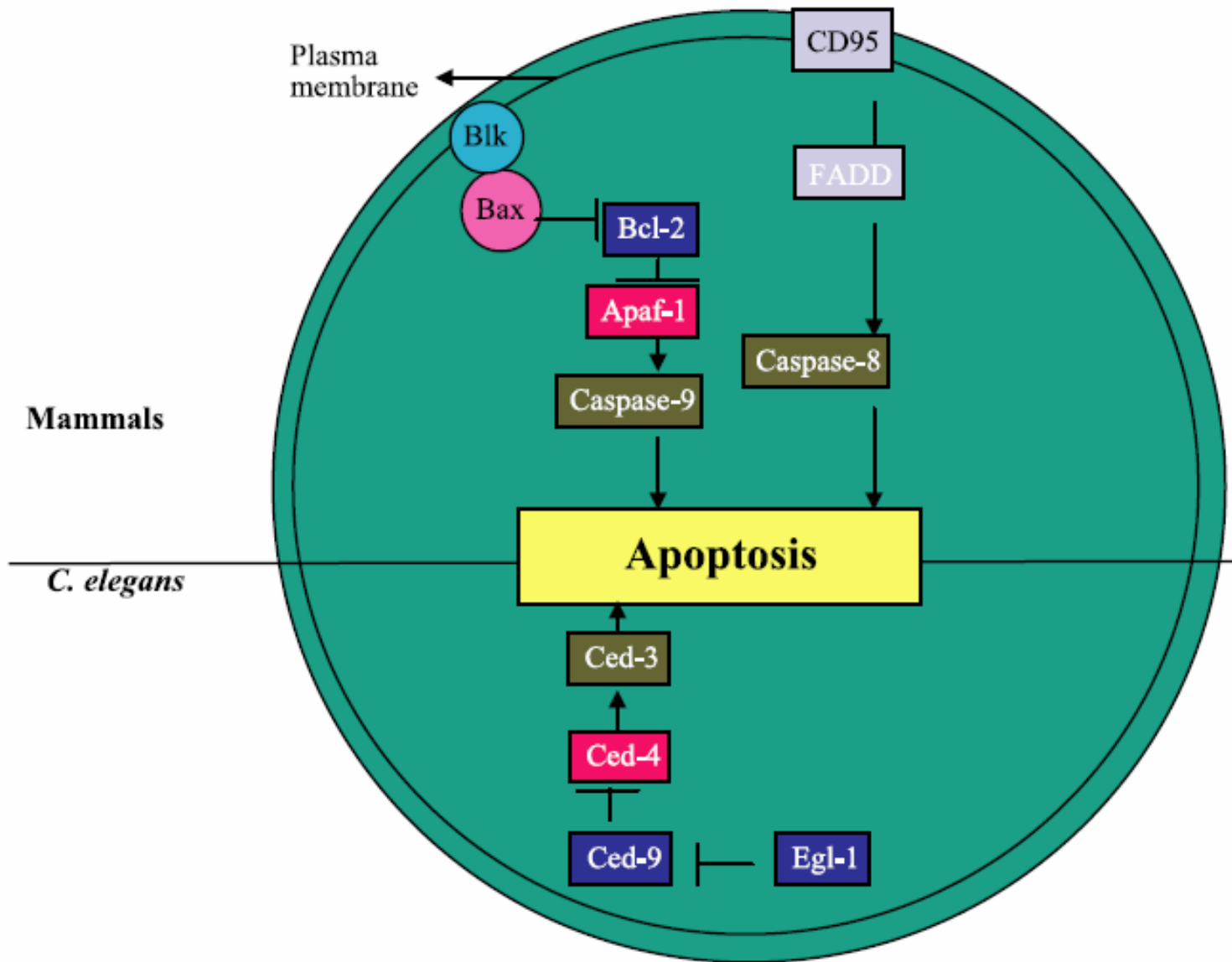


**za výzkum genetické regulace vývoje orgánů
a programované buněčné smrti**

Caenorhabditis elegans

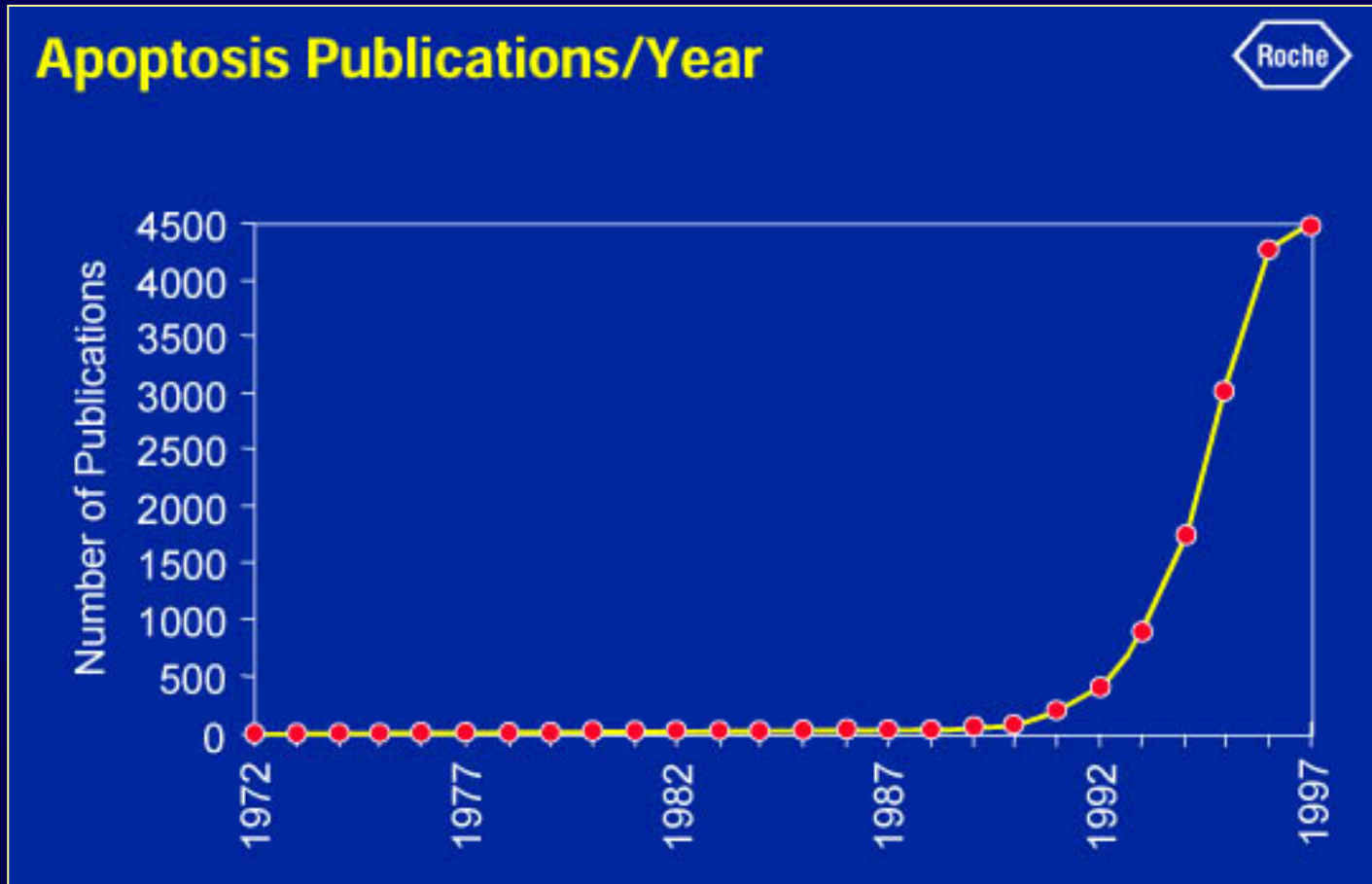


- 1090 somatických buněk,
z toho 131 podléhá apoptóze
- **regulace apoptózy - 14 genů Ced:**
Ced-3 (kaspáza 1), Ced-4 (Apaf-1) - indukce
Ced-9 (Bcl-2)- represe



Dlamini et al., 2004 (*Pharmacology & Therapeutics* 101, 1– 15)

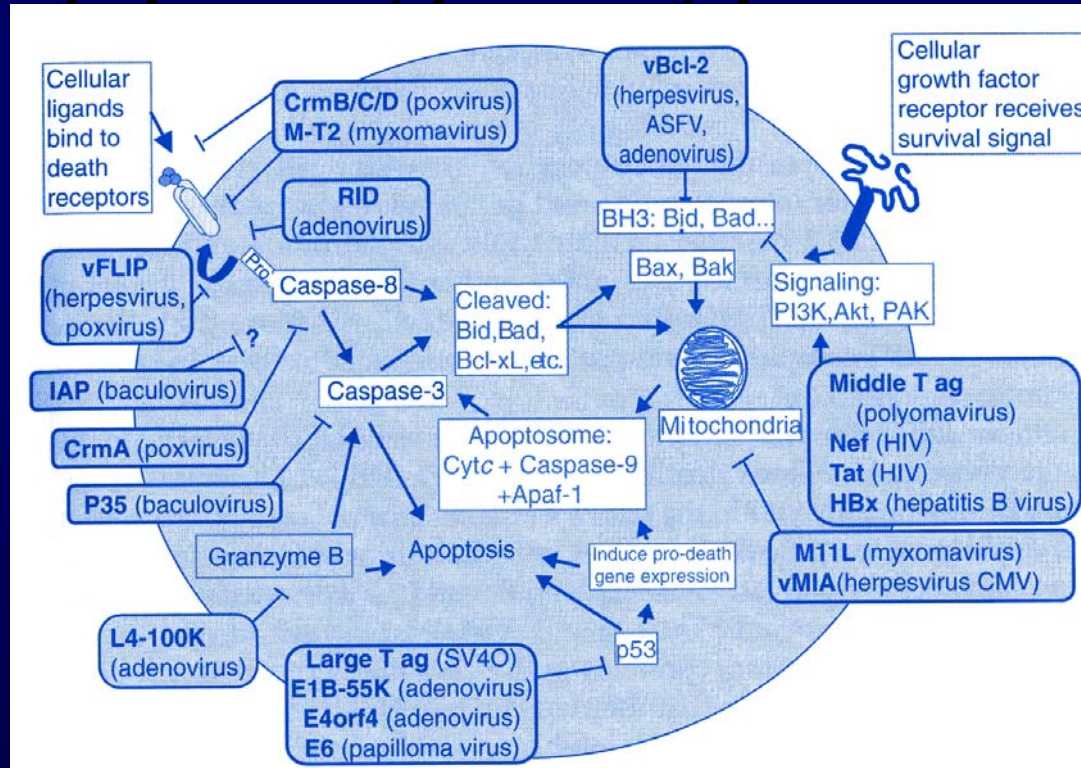
Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.
Apoptosis: A basic biological phenomenon with
wide ranging implications in tissue kinetics.
***British Journal of Cancer* (1972) 26, 239.**



Apoptóza a nádory

Viry, inhibující apoptózu transformovaných buněk:

- **Human papilloma virus (HPV):**
expresuje proteinu E6 – inaktivátor proteinu p53
- **Epstein-Barrové virus (EBV):**
produkuje protein, podobný proteinu Bcl-2



Apoptóza a nádory

Inhibice apoptózy nádorových buněk bez účasti virů:

- **leukémie:**
exprese vysoké hladiny Bcl-2 (translokace)
- **melanom:**
inhibovaná exprese genu pro Apaf-1
- **nádory plic a střeva:**
sekrece „decoy“ molekuly, která se váže na FasL a brání její vazbě na Fas (CTL buňku neusmrtí)
sekrece FasL nádorovými buňkami indukuje apoptózu CTL
80% CA střeva – mutace p53

Apoptóza a imunitní systém

Autoimunitní choroby:

- defekty v indukci apoptózy u CTL po odeznění imunitní odpovědi

lupenka

revmatoidní artritida

AIDS:

- pokles CD4+ a CD8+ T-lymfocytů
- pouze část infikována HIV, většina umírá apoptózou
- nejasný mechanismus indukce apoptózy
(HIV exprimuje geny Tat, Nef a Vpr které indukují vysokou hladinu Fas, FasL a změnu permeability mitochondriální membrány)

Apoptóza a degenerativní onemocnění

Alzheimerova choroba

Parkinsonova choroba

Huntingtonova choroba

nejasné mechanismy indukce apoptózy:

- **volné radikály**
- **nedostatečná hladina nervových růstových faktorů**
- **vysoká hladina neurotransmiterů**

Metodické aspekty studia apoptózy

1. Co detekovat?

- **morfologické příznaky (1972)**
blebbing membrány, kondenzace chromatinu, kolaps jádra, vznik apo-bodies
- **fragmentace DNA (1987)**
fragmenty: ladder, zlomy v řetězcích: TUNEL
- **aktivace proteolytické kaskády (1995)**
produkty proteolytického štěpení

Metodické aspekty studia apoptózy

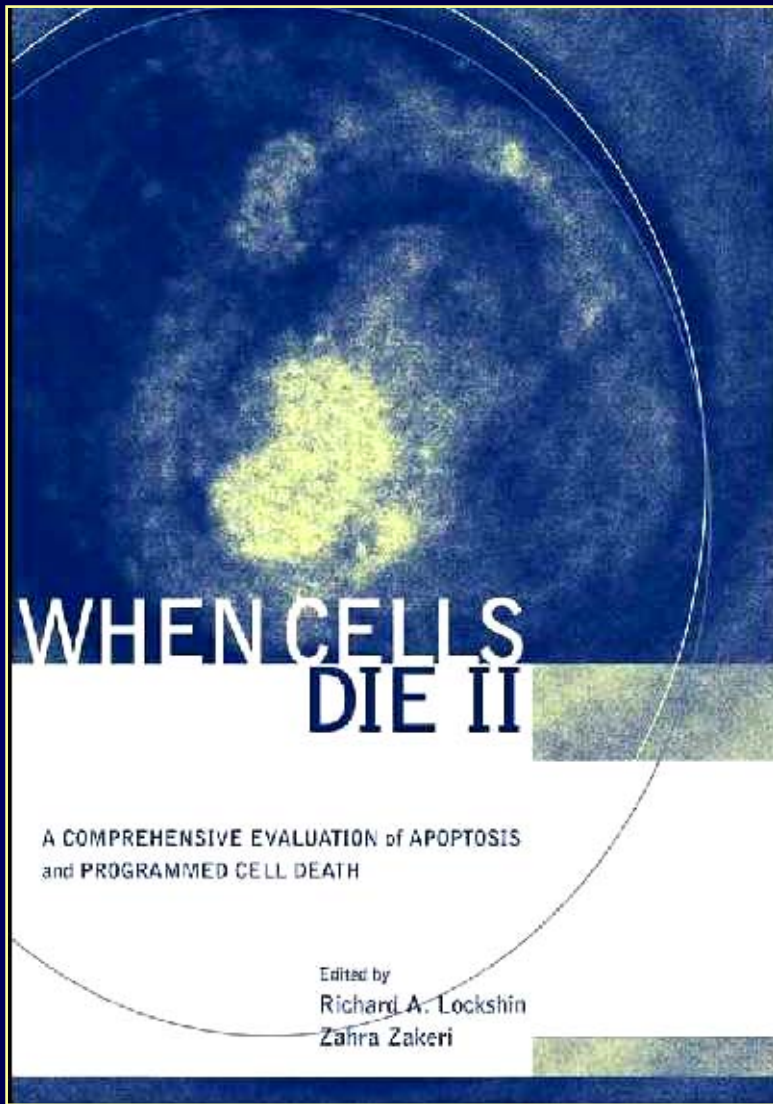
1. Co detekovat?

- **změny plazmatické membrány (1997)**
externalizace fosfatidylserinu: annexin-V
- **změny mitochondrií (1998)**
změny permeability mitochondriální membrány, detekce Cytochomu C a AIF

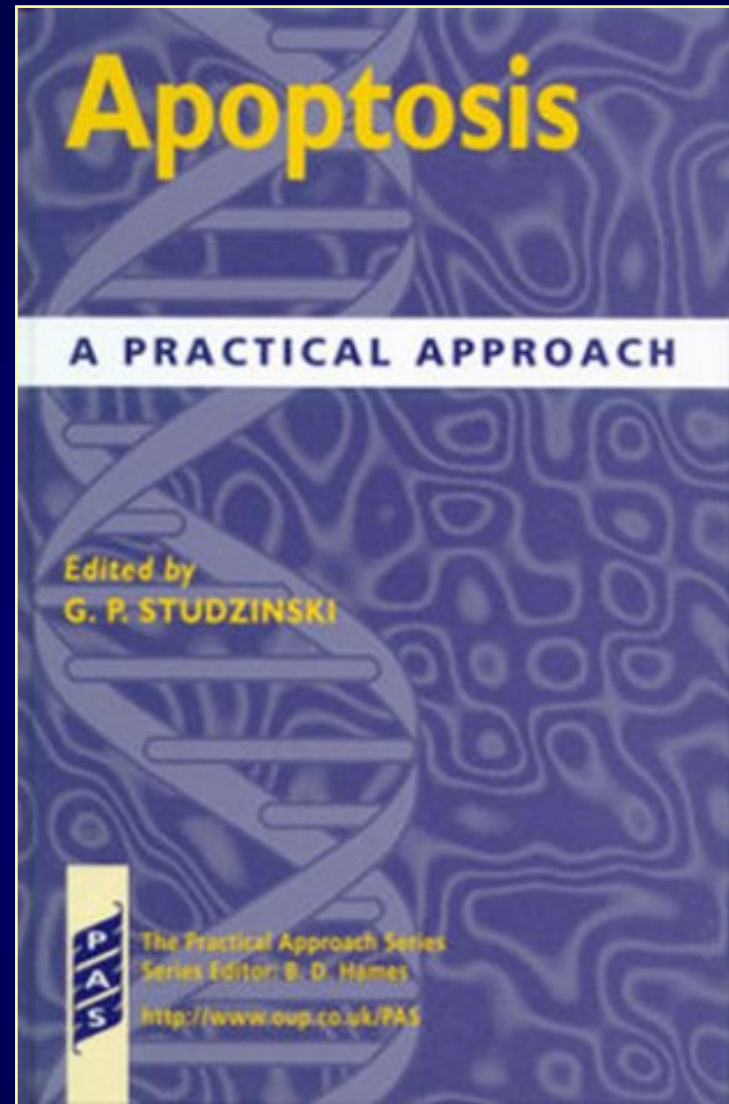
Metodické aspekty studia apoptózy

2. Jak detekovat?

- **Mikroskopie**
(světelná, fluorescenční, elektronová)
- **ELISA**
(spektrofotometrické hodnocení)
- **DNA-elektroforéza**
- **Flow cytometrie**
- **Western-blotting**



Lockshin, Zakeri



Studzinski