

Molekulární a buněčná biologie nádorů

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
MU Brno

Bi9910

středa 14.00 – 16.00

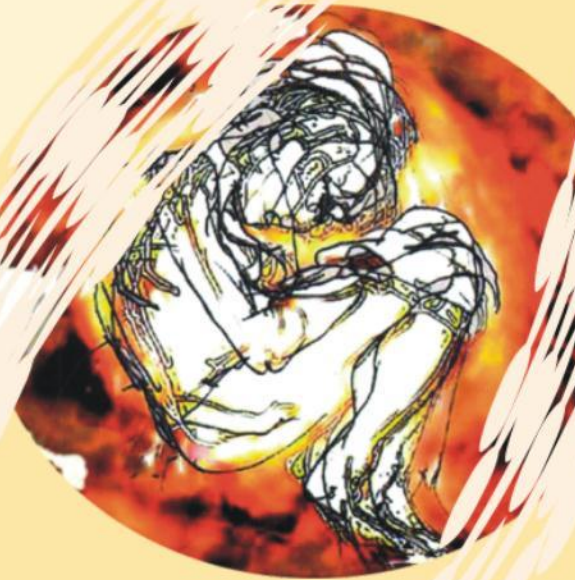
A11 – č. 306



2020

Molekulární a buněčná biologie nádorů

7. Apoptóza a nádory



Získané vlastnosti maligního nádoru



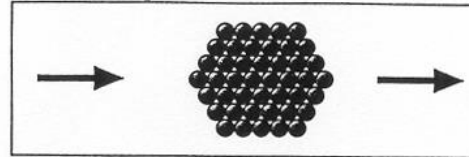
- (1) Produkce vlastních proliferačních signálů
- (2) Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
- (3) Odolnost k programované buněčné smrti
- (4) Neomezený replikační potenciál
- (5) Indukce angiogenese
- (6) Aktivace invazivity a metastazování
- (7) Genetická nestabilita a mutace
- (8) Přítomnost zánětu podporující nádor
- (9) Přeprogramování energetického metabolismu
- (10) Schopnost vyhnout se destrukci imunitním systémem
- (11) Změny mikroprostředí nádoru

Buněčná smrt a vývoj nádoru

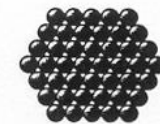


- Rychlost růstu tkání je určována na jedné straně rychlostí buněčného dělení a na straně druhé rychlostí buněčné smrti.
- Při homeostáze jsou oba procesy v rovnováze.
- U nádoru je rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí porušena.

A. Balanced proliferation and death

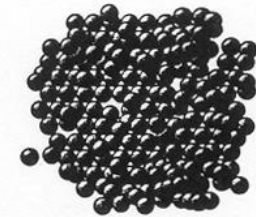
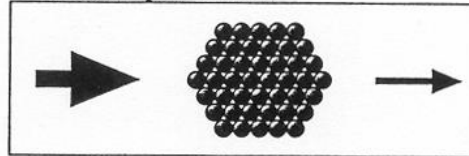


OUTCOME



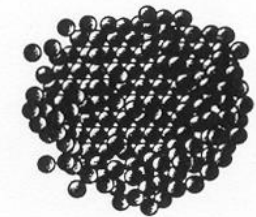
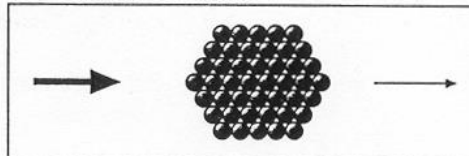
Homeostasis

B. Increased proliferation



Neoplasia

C. Decreased cell death



Neoplasia

Apoptóza a nekróza



Nekróza:

- týká se skupiny postižených buněk
- vyvolána nefyziologickým poškozením (virová infekce, hypotermie, hypoxie, metabolické jedy, ..)
- fagocytóza makrofágy
- významná zánětlivá reakce

Apoptóza - programovaná buněčná smrt:

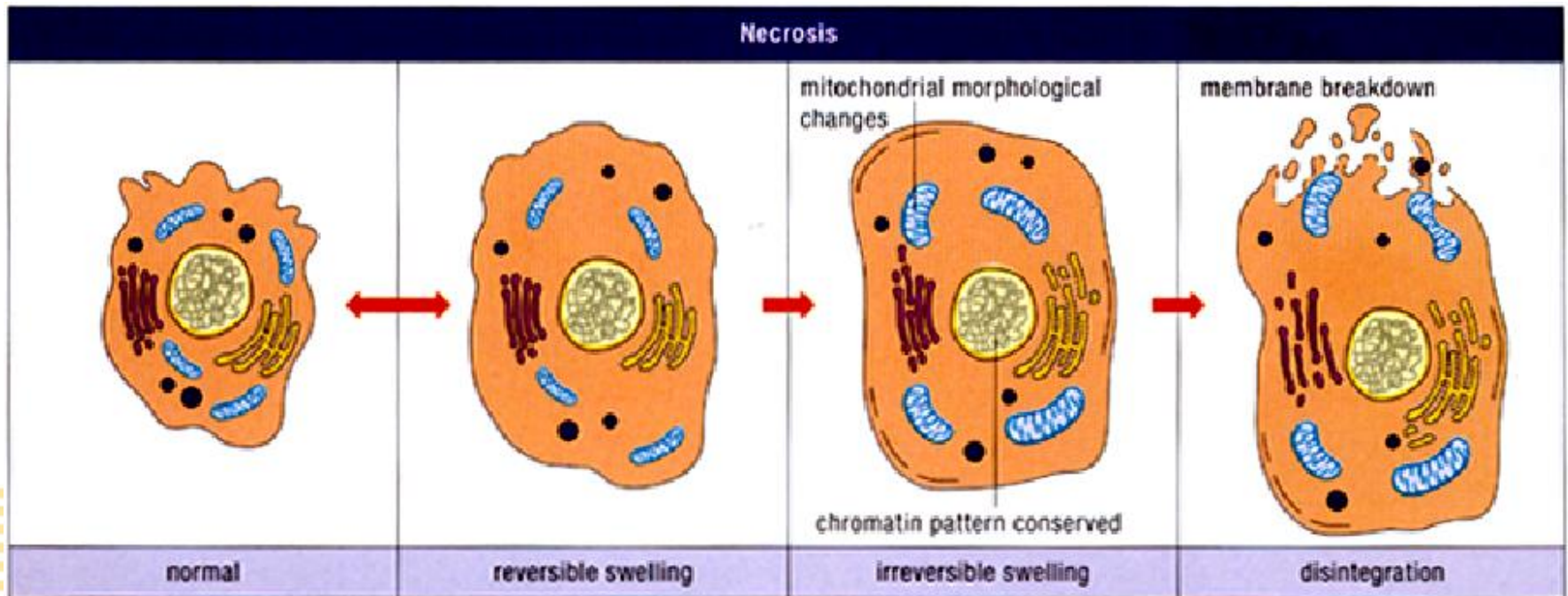
- postihuje jednotlivé buňky
- indukována i fyziologickými stimuly (nedostatek růstových faktorů, změny hormonálních hladin, ..)
- fagocytóza okolních buněk nebo makrofágy
- žádná zánětlivá reakce
- na rozdíl od nekrózy je popsáno mnoho příkladů **fyziologické** apoptózy

Nekróza



Morfologické znaky: začíná bobtnáním cytoplasmy a mitochondrií a končí úplnou lyzí, netvoří se vesikly, rozpadají se organely, ztráta integrity buněčné membrány

Biochemické znaky: ztráta regulace homeostáze, pasivní proces nevyžadující energii (běží i ve 4°C), nahodilá degradace DNA, postlytická fragmentace DNA (= pozdní událost během nekrózy)

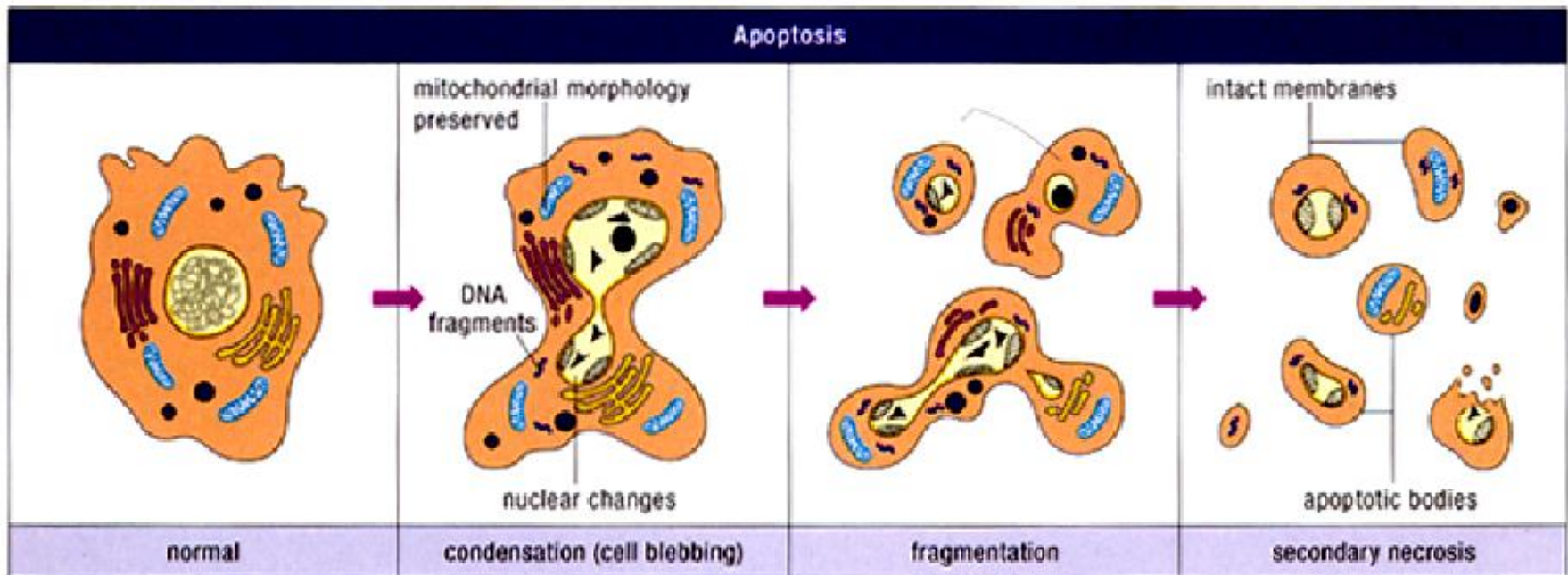


Apoptóza



Morfologické znaky: kondenzace buňky a jádra, výchlípky membrány („blebs“), kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a rozpad buňky na apoptotická tělíčka, membrána neztrácí svou integritu, ..

Biochemické znaky: přísně regulovaný, aktivní proces vyžadující energii (neběží při 4°C), nenahodilá fragmentace DNA (žebřík na ELFO), uvolňování specifických faktorů z mitochondrií do cytoplasmy, aktivace kaskád kaspáz, ..



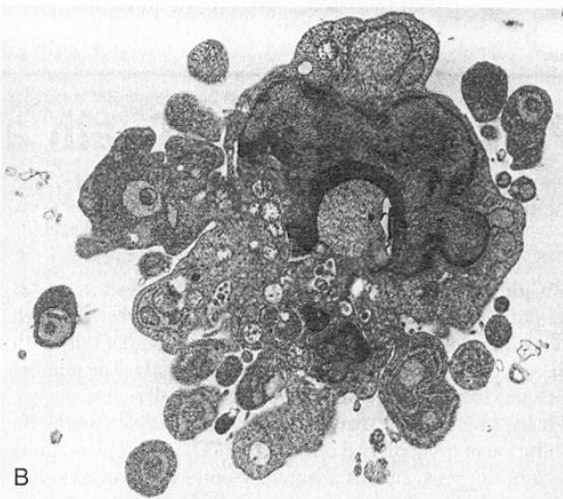
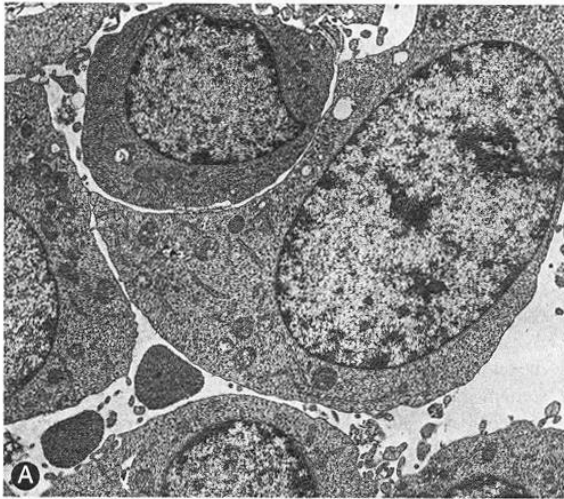
Buňky procházející apoptózou



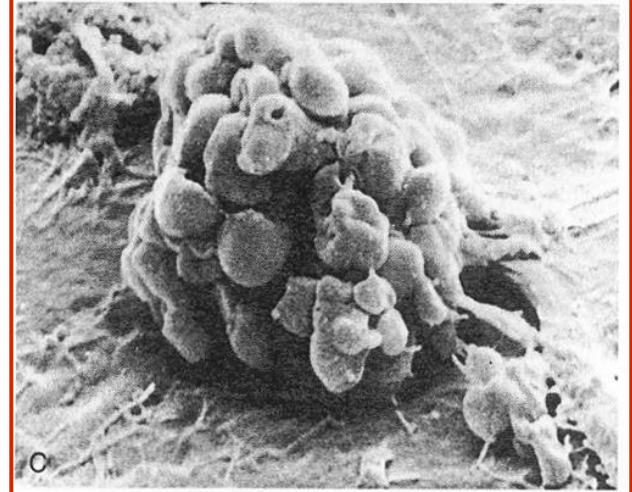
myší fibroblast

A. v přítomnosti séra

B. v nepřítomnosti séra



HeLa buňka 24 hod po
přidání aktinomycinu D



Další formy buněčné smrti

Nekroptóza

- programovaná nekróza indukovaná externími stimuly (ligandy) prostřednictvím proteinů RIP-1/RIP-3, je-li znemožněna apoptóza, např. inhibicí kaspázy-8

Autofagie

- degradační dráha, při níž jsou poškozené organely nebo nevyužívané proteiny degradovány v autofagosomech za uvolnění energie

Aponekróza

- nedochází k dokončení apoptózy, v konečných stádiích se objevují známky nekrózy; klíčový je pravděpodobně intracelulární obsah ATP: není-li ATP k dispozici, je zánik buňky dokončen formou nekrózy

Paraptóza

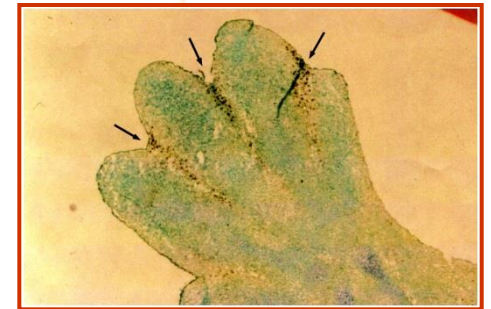
- nápadná tvorba vakuol a nabobtnání mitochondrií; nesouvisí s apoptózou

Apoptóza je fyziologický proces



Buněčná smrt se v mnohobuněčném organismu objevuje během celého vývoje. Je součástí embryogeneze a organogeneze např.:

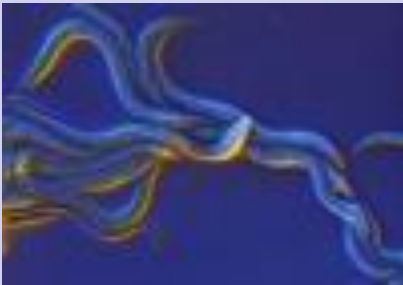
- hormonálně regulovaná involuce „pulčního“ ocasu během vývoje
- odumírání neuronů během vytváření CNS
- odumírání buněk během tvorby končetin,...



Apoptóza v dospělém organismu je součástí fyziologických procesů a odstraňuje škodlivé buňky, např.:

- negativní selekce autoreaktivních lymfocytů
- smrt buněk napadených virem
- buňky s poškozenou DNA

Regulace apoptózy u hlísta *Caenorhabditis elegans*



- Bob Horvitz
- Nobel prize 2002

- *háďátka obecné*
- zcela průhledné tělo
- 131 z 1090 somatických buněk umírá během vývoje apoptózou
- průměrná délka života 20 dní

Změny v regulaci apoptózy jsou patologické



Zvýšená apoptóza

- syndrom získané imunodeficience AIDS (CD4⁺ T-buňky)
- neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova choroba)
- myelodysplastický syndrom (hypercelulární dřeň, periferní cytopenie)
- některé autoimunitní nemoci
- spinální svalová atrofie, roztroušená skleróza,...

Nedostatečná apoptóza

- nádory, MDS,...
- některá autoimunitní onemocnění
- virové infekce

Regulace apoptózy u hlísty *Caenorhabditis elegans*



C. elegans byl prvním modelem pro studium molekulárních mechanismů apoptózy.

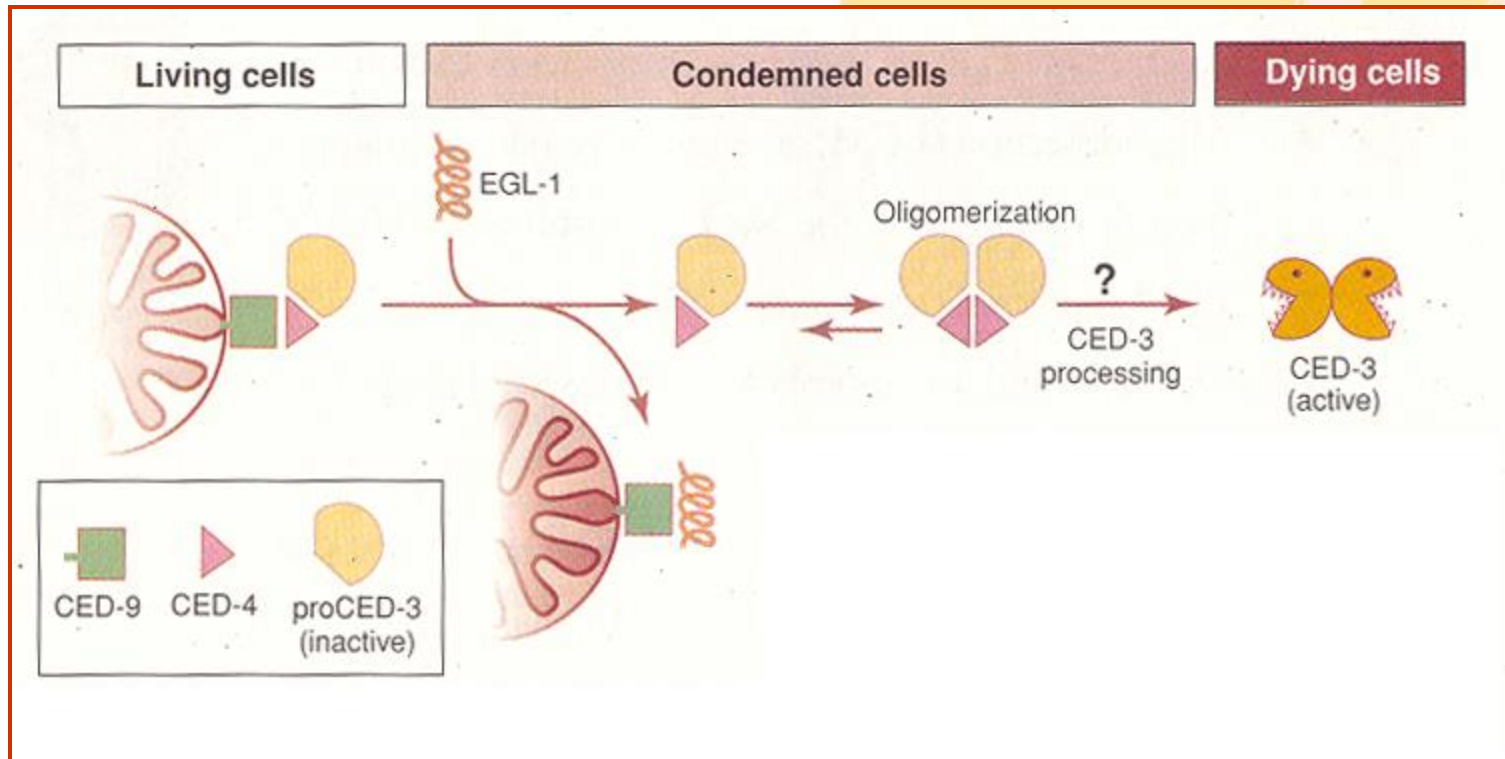
Pro apoptózu *C. elegans* jsou klíčové 3 proteiny:

- **CED-3** je kaspáza - cysteinová proteáza; existuje ve formě zymogenu - neaktivního proenzymu, který je aktivován „by self-cleavage“.
- **CED-4** se váže na CED-3 a iniciuje jeho aktivaci
- **CED-9** se váže na CED-4 a zabraňuje tak aktivaci CED-3

Normálně tvoří CED-9, CED-4 a CED-3 neaktivní komplex.

Apoptóza je stimulována disociací CED-9 a následnou aktivací CED-3.

Regulace apoptózy u *Caenorhabditis elegans*



U buněk určených k apoptóze protein EGL-1 odstraní z komplexu CED-4/CED-3/CED-9 protein CED-9, zbylý komplex oligomerizuje a následně se aktivuje CED-3.

Regulace apoptózy v buňkách obratlovců



V buňkách obratlovců se vyvinuly celé rodiny genů, které ale odpovídají genům buněčné smrti *C. elegans*.

- **Kaspázy** jsou podobné **CED-3**.
- Jediný dosud známý homolog **CED-4** je **Apaf-1**.
- Proteiny z rodiny **Bcl-2** jsou homologní **CED-9**, s tím rozdílem, že některé proteiny z rodiny Bcl-2 jsou antiapoptotické, jiné jsou ale proapoptotické.

Regulace apoptózy



Apoptotická mašinerie je držena pod kontrolou i díky signálům přežití, které přicházejí z vnějšího prostředí, a díky vnitřním signálům, které monitorují buněčnou integritu.

Apoptóza je indukována, když například:

- buňka ztratí kontakt s vnějším prostředím (anoikis)
- buňka je neopravitelně poškozena
- buňka simultánně dostává signály indukující buněčné dělení a apoptózu
- buňka dostává signály smrti (smrtící signály)

Regulace a průběh apoptózy



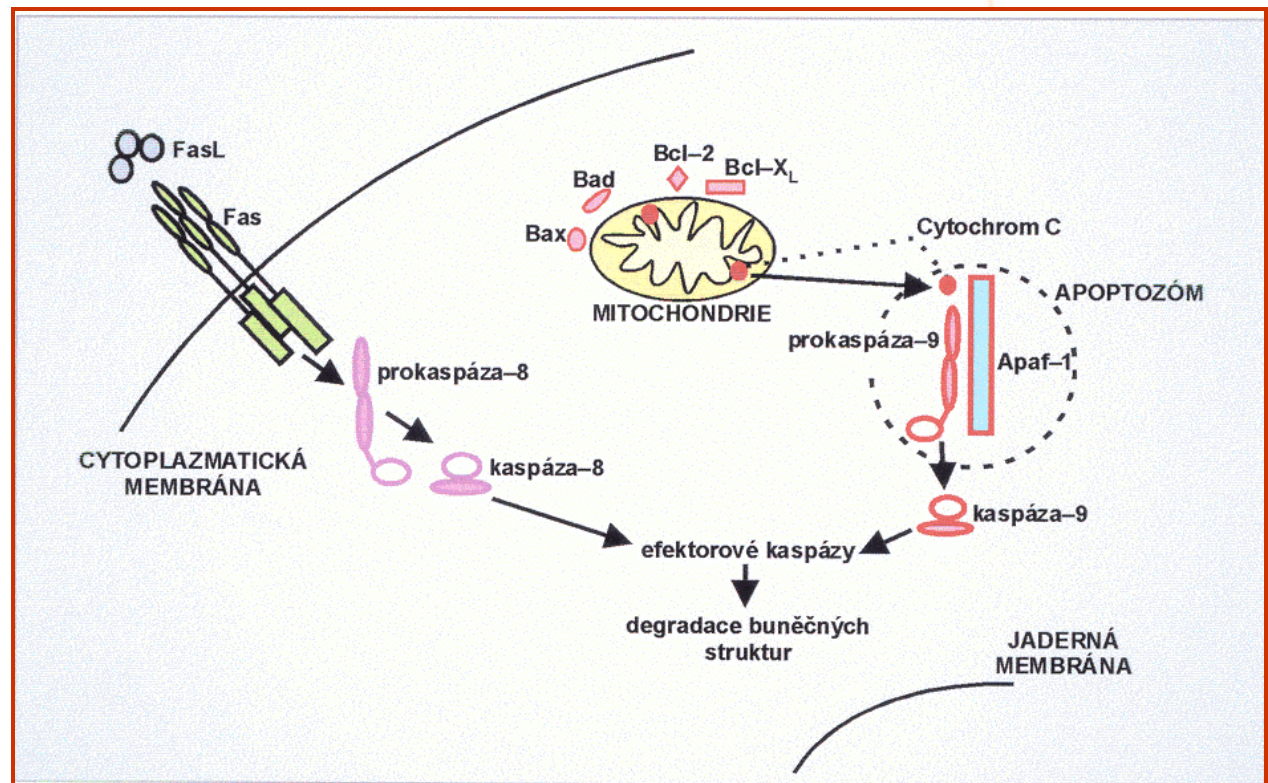
Vnější cesta receptorová: vazbou ligandu na příslušný **receptor smrti** vzniká proapoptotický signál. Ten vede k aktivaci domény smrti za kooperace dalších proteinů. Cílem je aktivace **prokaspázy 8**.

Vnitřní cesta: signalizací (např. přes p53) je zahájen apoptotický děj, jehož složkou je systém **Bcl-2/Bax**, signalizace přes **mitochondrie**, tvorba komplexu nazývaného **apoptozóm** a cílem je aktivace **prokaspázy 9**.

Regulace a průběh apoptózy



1. Signalizace přes receptory
2. Vnitřní signalizace (mitochondrie)
3. Efektory apoptózy



Receptory smrti



- Jsou povrchové receptory, které přenášejí proapoptotické signály indukované ligandy smrti.
- Mohou aktivovat kaspázy během sekund po vazbě ligandů a způsobit odstranění buňky během několika hodin.
- Patří do superrodiny **receptoru TNF** (*tumor necrosis factor*):
 - mají podobnou strukturu extracelulární domény (bohatou na cystein)
 - obsahují homologní cytoplasmatickou **doménu smrti**, která jim umožňuje přímo interagovat s apoptotickým aparátem

Receptory smrti a jejich ligandy



- Fas (CD95, Apo1) - FasL, CD95L
- TNFR1 (p55, CD120a) - TNF, lymphotoxin
- DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD) - Apo3L (TWEAK)
- DR4 - Apo2L (TRAIL)
- DR5 (Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2, KILLER) - Apo2L (TRAIL)
- DR6 (TNFRSF21) - ? N-APP
- /EDAR (ectodysplasmin A receptor); NGFR (nerve growth factor receptor)/

Fas/CD95 - FasL/CD95L



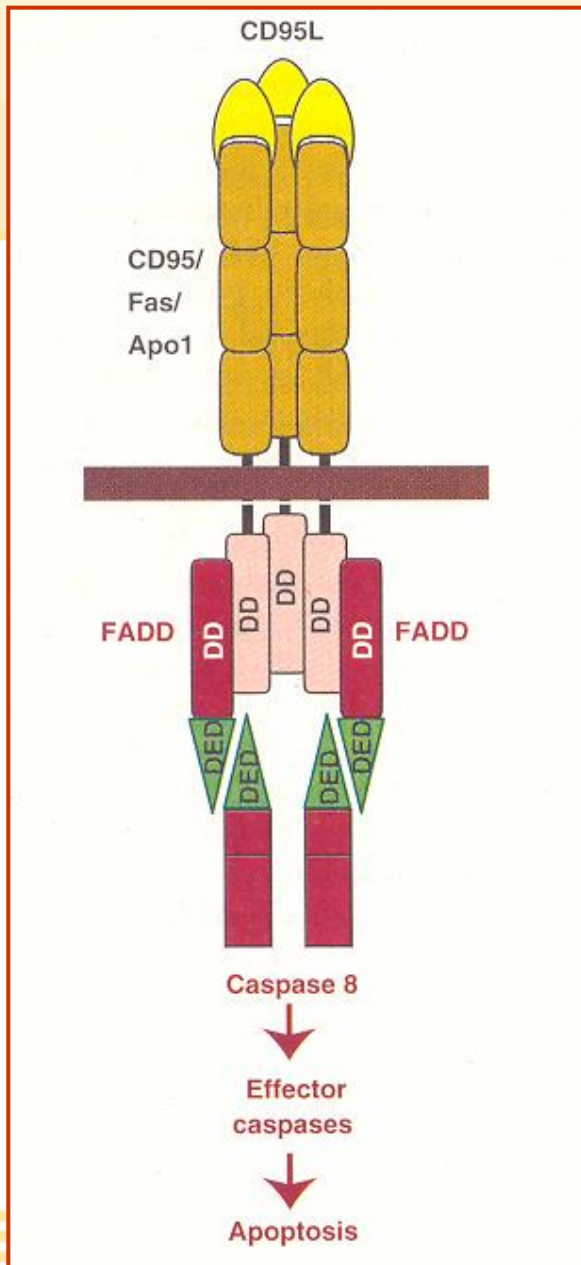
CD95L je homotrimer - váže se na **tři** receptory **CD95** - a způsobuje jejich klastrování - na tuto strukturu se váže adaptorový protein **FADD** (*Fas-associated death domain*) a prostřednictvím vlastní domény smrti interaguje s podobnou doménou na **kaspáze 8**, která je touto interakcí indukována k aktivaci seberoštěpením a může dále aktivovat další kaspázy, např. kaspázu-3, -7,.. (amplifikace).

Expres Fas v mnoha buňkách, exprese FasL více omezena, téměř výlučně na aktivované T lymfocyty a NK buňky.

Fyziologická apoptóza:

- periferních aktivovaných T-buněk na závěr imunitní odpovědi
- odstranění např. virem infikovaných nebo nádorových buněk T-buňkami nebo NK buňkami

Apoptotická signalizace receptorem CD95



DD - death domain

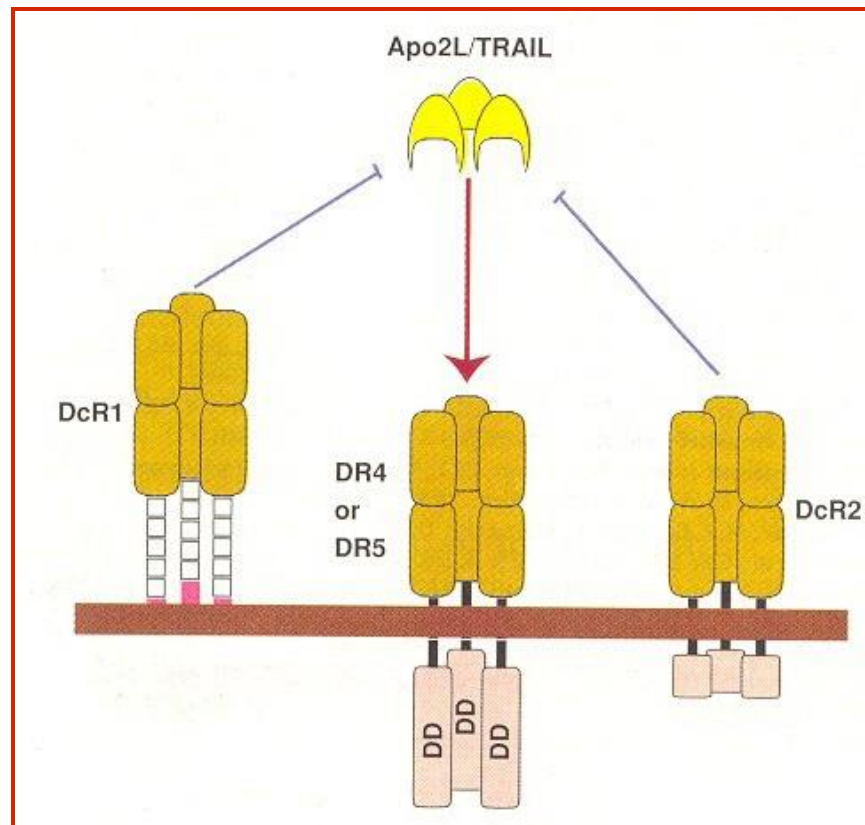
DED - death effector domain

Regulace receptorů smrti: decoy receptor



- kompetují s funkčním receptorem o vazbu ligandu – „vychytávají“ ligand (**decoy** = návnada vs. **decay** = rozklad, rozpad), například:
- **DcR3** („decoy receptor 3“): váže ligand FasL, a tím blokuje jeho vazbu k funkčnímu receptoru Fas
- **DcR1 (TRID, TRAIL-R3, LIT)** - má podobnou strukturu jako DR4 a DR5, ale zcela postrádá cytoplazmatickou část; mají glycosyl-fosfatidylinositolovou skupinu, kterou jsou přichyceny na membránu
- **DcR2 (TRAIL-R4, TRUNDD)** - má zkrácenou cytoplazmatickou část o kritické aminokyseliny nutné k vyvolání odpovědi, tj. k přenesení signálu

Další způsob regulace receptorů smrti: decoy receptor

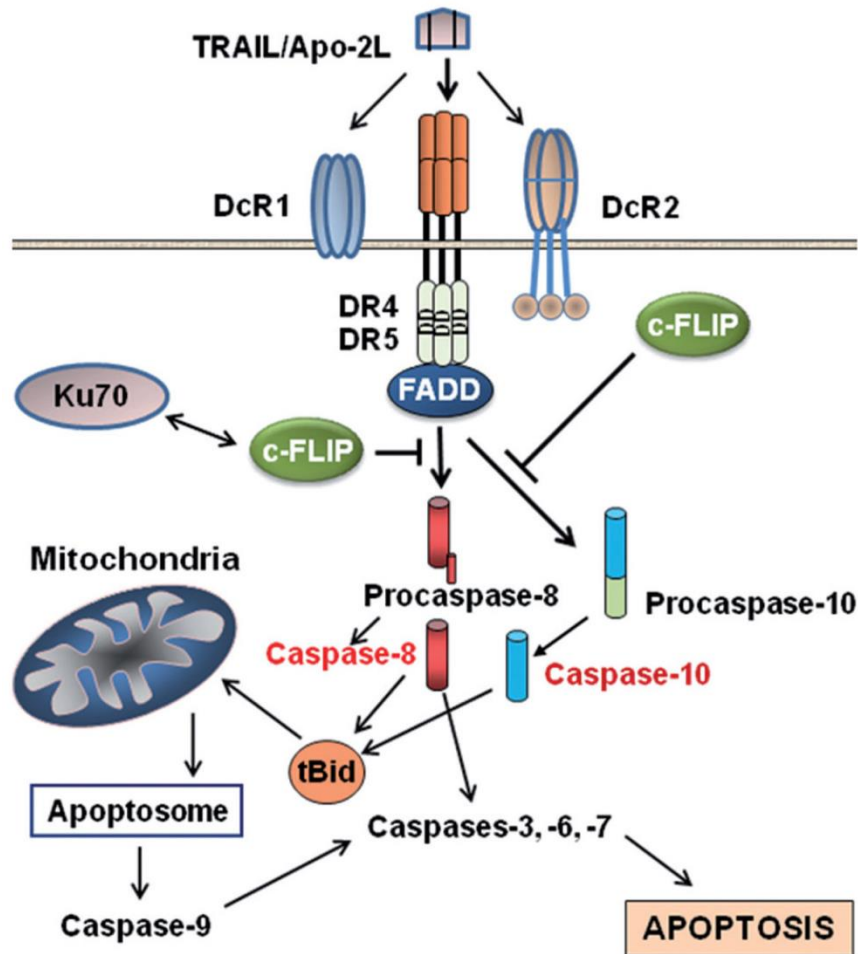


Regulace receptorů smrti: c-FLIP



- antiapoptotický protein **cFLIP** („FLICE-like inhibitory protein“; FLICE – „FADD-like ICE“ - původní označení pro kaspázu 8): strukturně podobný kaspáze-8 (obsahuje DED doménu/y), ale bez enzymatické aktivity – váže se na FADD a znemožňuje vazbu prokaspázy-8 (a -10)
 - několik isoformem s odlišnými funkcemi
 - zasahuje i do regulace programované nekroptózy a autofagie
 - zvýšená exprese c-FLIP nalezena u mnoha nádorů (např. CRC, ca močového měchýře, čípku, některé lymfomy, ca jater,..); často spojeno s horší prognózou

Regulace receptorů smrti: c-FLIP



Fas/FasL brzdí kancerogenezi



- Vrozené defekty v expresi nebo funkci Fas způsobují vrozené dispozice k autoimunitním nemocem, ale jsou také spojeny se zvýšeným rizikem vývoje nádoru.

⇒ Signalizace Fas/FasL je **nádorově supresivní**.

Fas/FasL a nádory

- mutace receptoru Fas
- snížená exprese receptoru Fas
- amplifikace genu pro DcR3 u některých nádorů plic a kolorektálních karcinomů

TNFR1 - TNF



TNF je produkován hlavně aktivovanými makrofágy a T-buňkami jako odpověď na infekci.

Aktivace TNFR1 vede jednak k zánětlivé odpovědi organismu (aktivaci NF- κ B a AP-1), u některých buněčných typů k apoptóze. Na rozdíl od CD95, TNFR1 nevyvolává apoptózu, pokud není blokována syntéza proteinů (\rightarrow existence proteinů blokujících apoptózu).

Po vazbě **TNF** receptor **TNFR1** tvoří trimery a dochází tak k asociaci jejich domén smrti. Na ně se váže adaptorový protein **TRADD** („TNFR associated DD“), který funguje jako platforma pro vazbu dalších proteinů - **TRAF2** a **RIP**, které stimulují aktivaci transkripčních faktorů **NF- κ B** a **AP-1**.

Ke komplexu TNFR1-TRADD se může vázat adaptor **FADD**, který potom aktivuje **kaspázu-8**.

DR3 – Apo3L



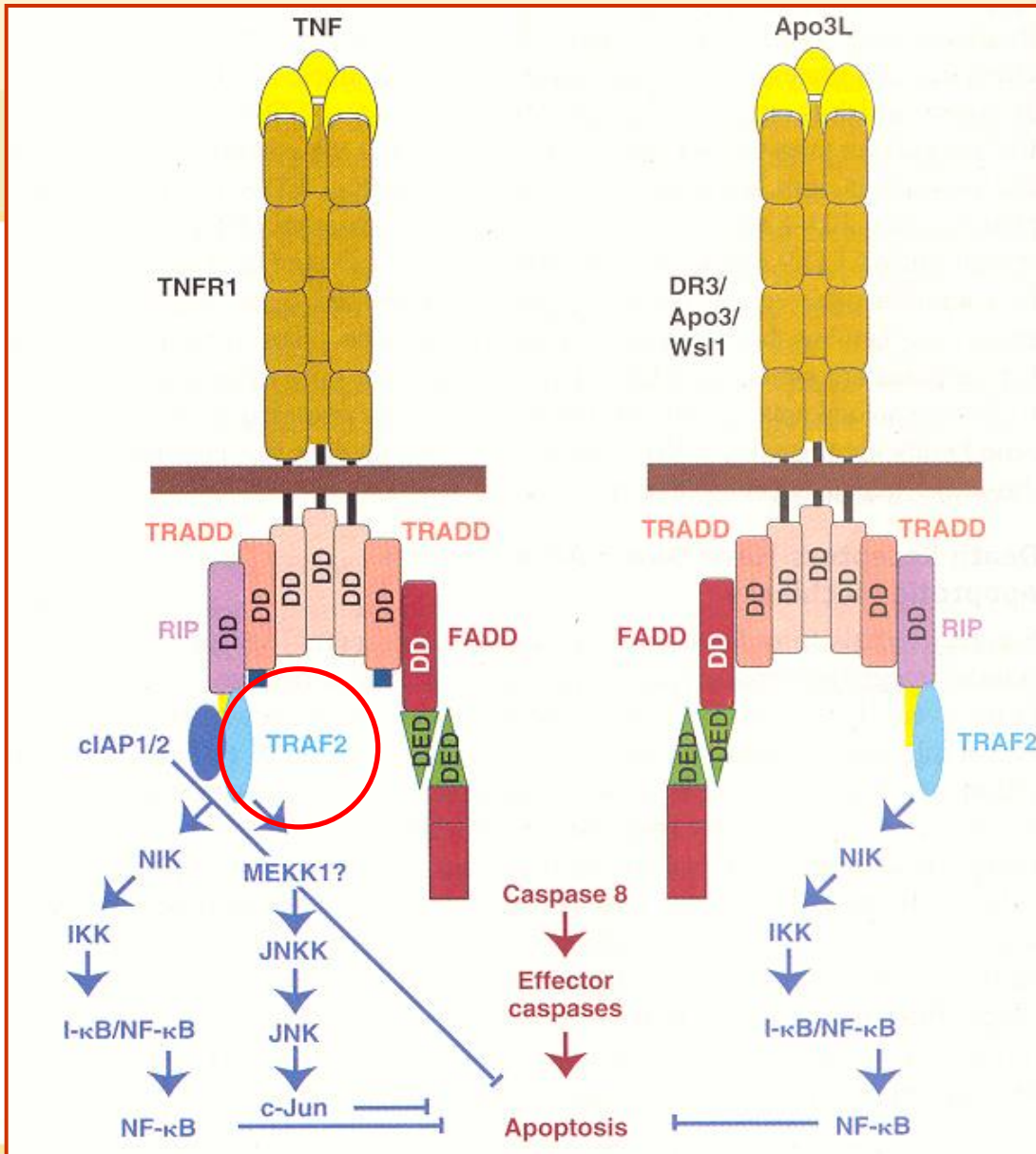
Receptor DR3 je velice podobný TNFR1, po stimulaci aktivuje NF- κ B přes TRADD, TRAF2 a RIP a indukuje apoptózu přes **TRADD**, **FADD** a **kaspázu-8**.

Funkčně jsou DR3 a TNFR1 velmi podobné, ale zásadně se liší expresí svou a svých ligandů:

- TNF je exprimován hlavně u aktivovaných makrofágů a lymfocytů, zatímco Apo3L je konstitutivně exprimován téměř ve všech tkáních.
- Naopak TNFR1 je exprimován obecně ve všech tkáních, zatímco DR3 je přítomen hlavně ve slezině, thymu a v periferní krvi a je indukován aktivovanými T-buňkami.



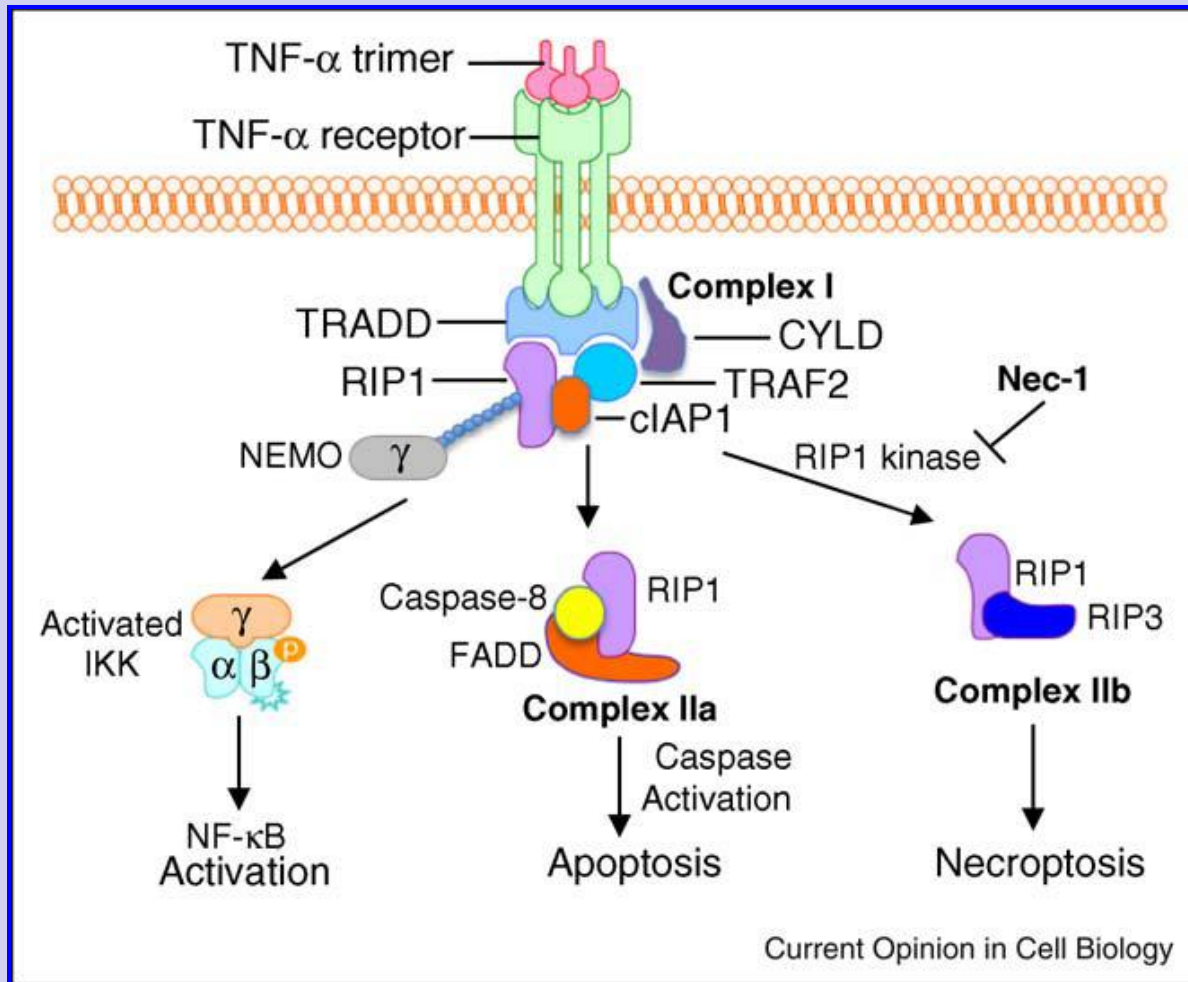
Apo signalizace receptory TNFR a DR3



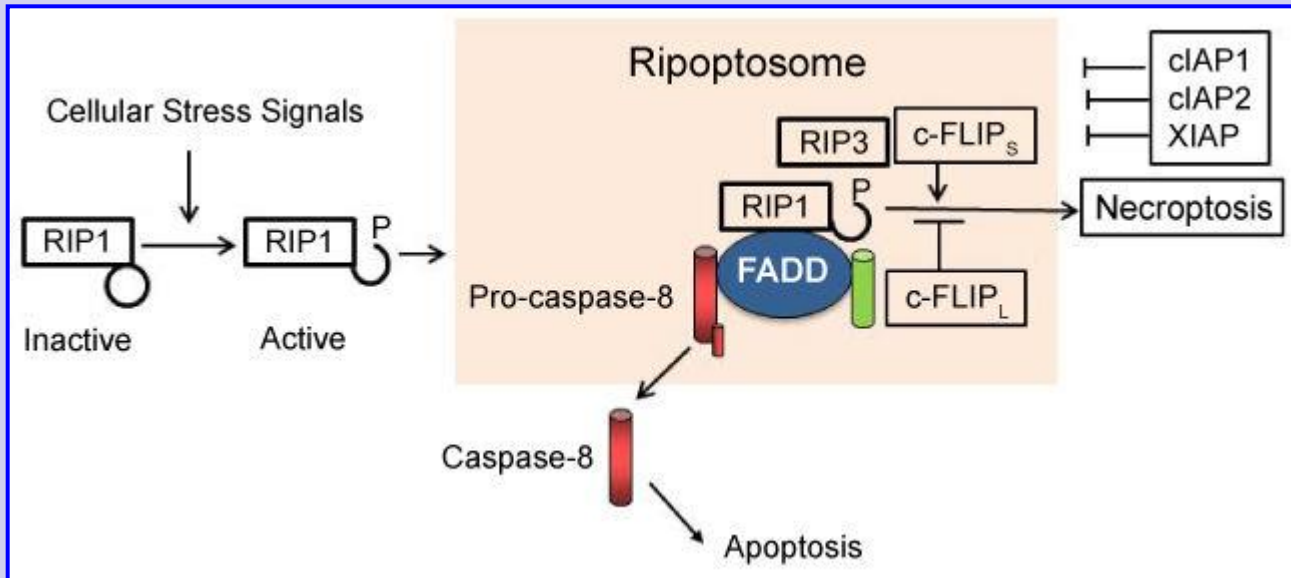
Nekroptóza

- nekroza indukovaná externími stimuly (ligandy) prostřednictvím receptorů smrti, je-li znemožněna apoptóza, např. působením inhibitorů kaspázy-8
- proces je **regulovaný**, ale morfologicky shodné znaky s neregulovanou nekrotickou buněčnou smrtí
- klíčovým hráčem regulace je kináza **RIP1** (*receptor-interacting protein 1*)

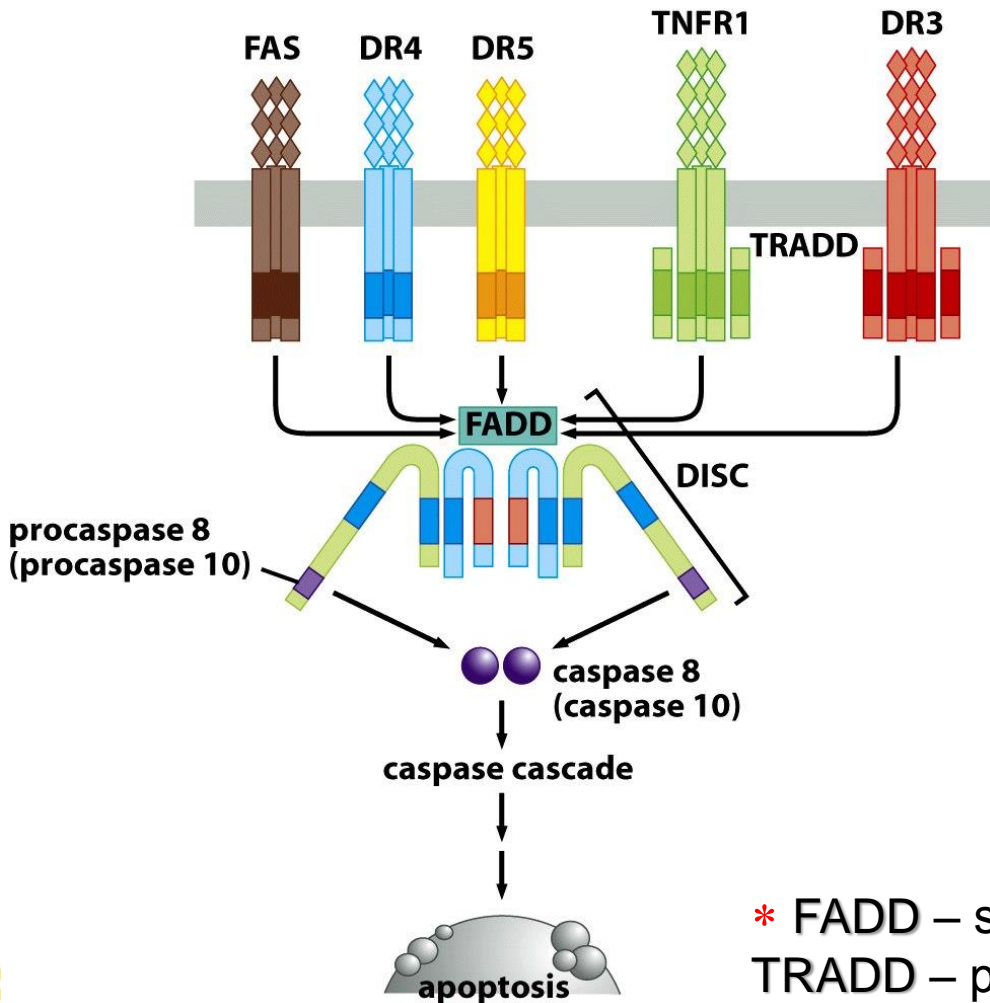
Nekroptóza



Inhibitor apoptozy **c-FLIP** inhibuje i nekroptózu



Receptory smrti: DISC



po vazbě ligandů cytoplasmatické části těchto receptorů - prostřednictvím FADD nebo TRADD* domén – vytvářejí **DISC** („death-inducing signaling complex“: *ligand-receptor-adaptor*), který štěpí prokaspázu 8 na aktivní kaspázu 8

* FADD – spojeno primárně s indukcí apoptózy;
TRADD – primárně indukce zánětlivé odpovědi

Receptory smrti a jejich ligandy



- CD95 (Fas, Apo1) - CD95L, FASL – primárně stimulace apoptózy
- TNFR1 (p55, CD120a) - TNF, lymphotoxin - primárně stimulace zánětu
- DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD) - Apo3L (TWEAK) - primárně stimulace zánětu
- DR4 - Apo2L (TRAIL) - primárně stimulace apoptózy
- DR5 (Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2, KILLER) - Apo2L (TRAIL) – primárně stimulace apoptózy
- DR6 (TNFRSF21)- ? N-APP - úloha zatím nejasná

Využití receptorů smrti k indukci apoptózy nádorových buněk



Pro:

- DR mají přímou návaznost na apoptotickou mašinerii
- navozují apo nezávisle na p53 apod.

Proti:

- silné vedlejší účinky působení **CD95L** a **TNF** - šok připomínající septický šok (indukce zánětlivých odpovědí!!)

Úloha mitochondrií v apoptóze



Mitochondrie hrají klíčovou úlohu v regulaci buněčné smrti.

(Endosymbiotický původ mitochondrií a evoluce aerobního metabolismu u eukaryot vytvořily základ pro evoluci aktivní buněčné smrti.)

Pro průběh apoptózy je klíčové vytvoření **apoptozómu**, proteinového komplexu, který je nutný k aktivaci iniciační kaspázy. Apoptozóm je tvořen **cytochromem C**, **Apaf-1** a **prokaspázou-9**. Kritické pro vytvoření apoptozómu je uvolnění cytochromu C z mitochondrií.

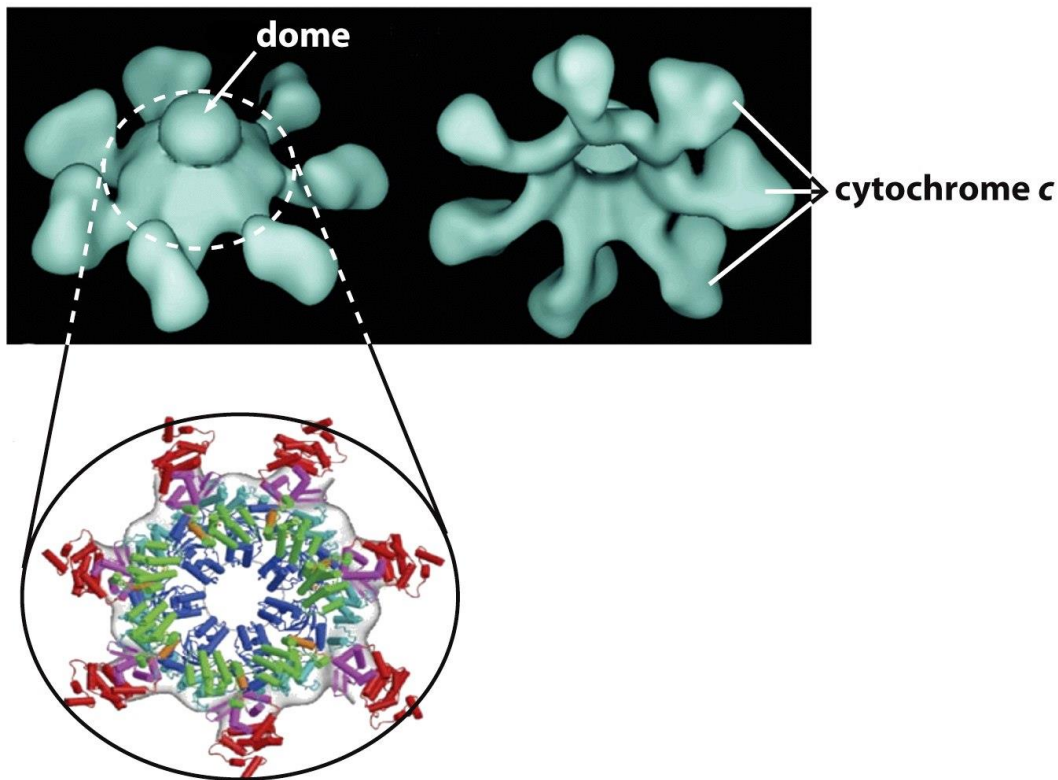
Úloha mitochondrií v apoptóze



Z mitochondrií uvolněny i další **pro**-apoptotické faktory:

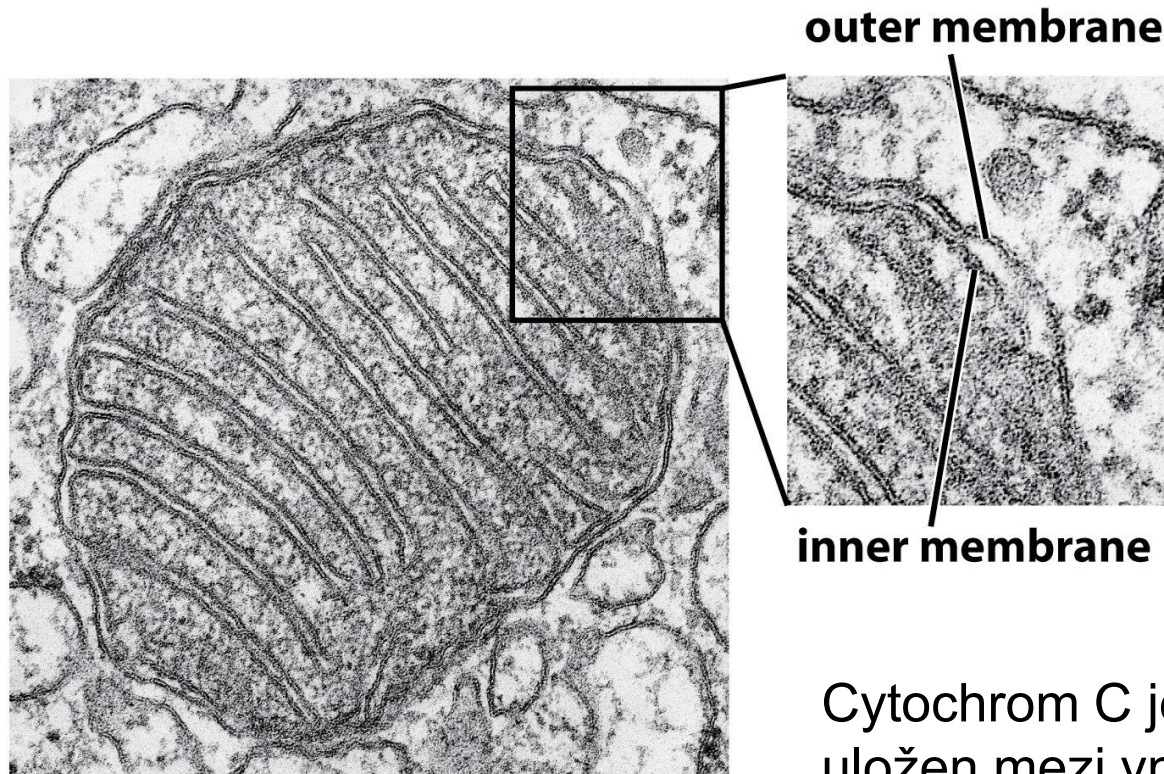
- **cytochrom c**
- **AIF** (*apoptosis-inducing factor*)
- **Smac** (*second mitochondria-derived activator of caspase*)
- **DIABLO** (*direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*)
- **Omi/HtrA2** (*high temperature requirement protein A*)
- **endonukleáza G**
- některé **prokaspázy** (-2, -3, -9)

Apoptozóm: „kolo smrti“



Apoptozóm se tvoří v cytosolu, je-li uvolněn **cytochrom C** z mitochondrií a asociuje s **Apaf-1**. Tak se vytvoří sedmiramenné kolo, kde ramena jsou tvořena sedmi podjednotkami Apaf-1 a jejich vrcholy tvoří cytochrom C (**červená**). Toto kolo přitahuje **prokaspázu 9**, která se váže do středu/osy kola (**modrá**) a je aktivována na kaspázu 9

Úloha mitochondrií v apoptóze



outer membrane

inner membrane

Cytochrom C je v mitochondriích uložen mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou.

Regulace permeability mitochondriální membrány



Bylo popsáno mnoho molekul, které ovlivňují permeabilitu mitochondriální membrány - mitochondrie tak fungují jako **integrátory** (pro- a anti-) apoptotických signálů.

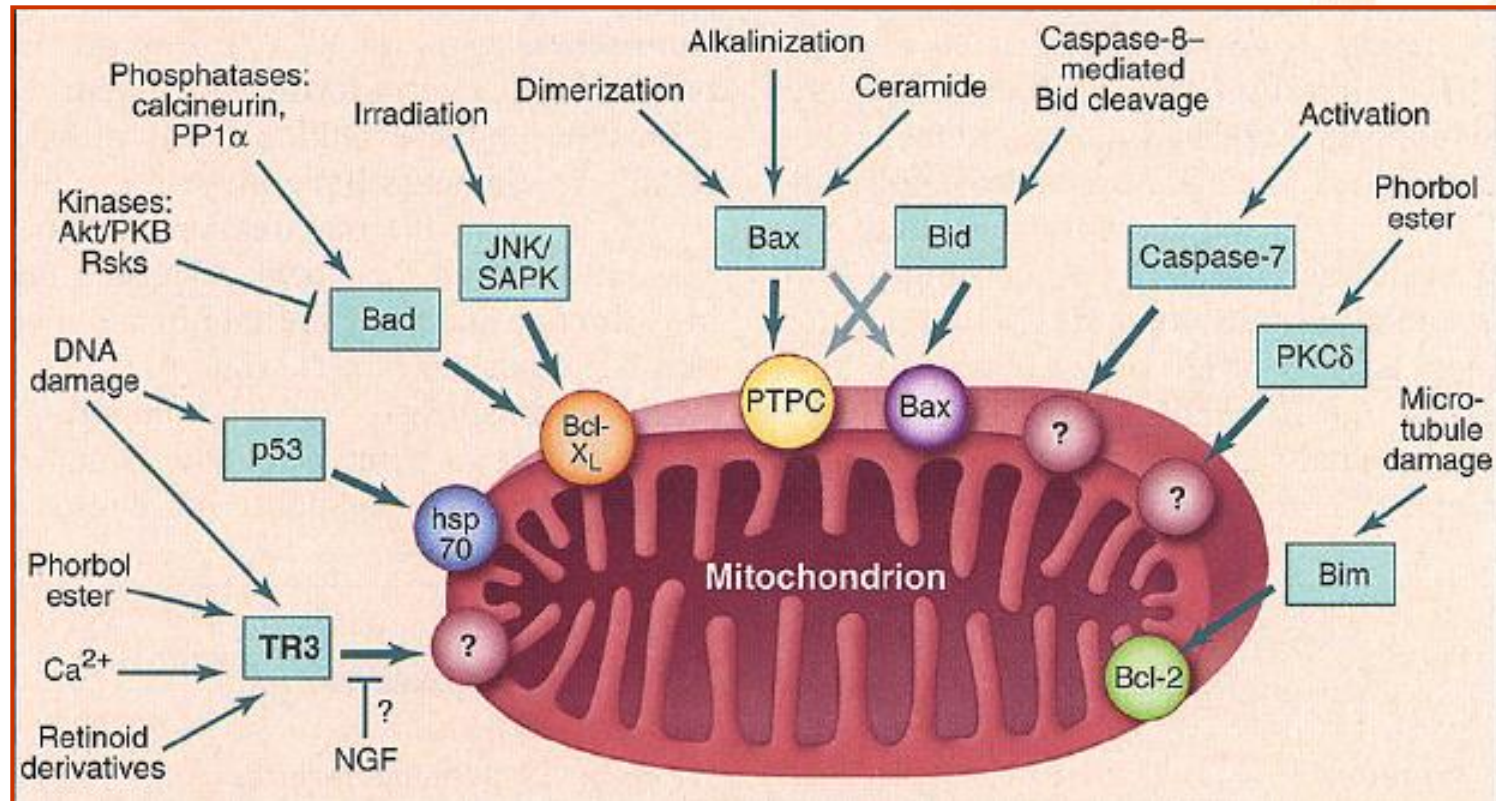
- Především proteiny z rodiny **Bcl-2***. Je to rodina (asi 25) proteinů strukturou a funkcí homologní s proteinem **CED-9**. Některé proteiny z rodiny Bcl-2 mají antiapoptotickou funkci: **Bcl-2**, **Bcl-X_L**, **Bcl-W**, některé proapoptotickou funkci: **Bax**, **Bak**, **Bid**, **Bim**.

* *BCL2* („B-cell lymphoma gene-2“) byl první apoptotický gen objevený v savčích buňkách (1988) díky své roli v maligní přeměně B-buněk - tak také poprvé popsána nová třída **proto-onkogenů**: ne aktivátory buněčné proliferace, ale blok buněčné smrti.

t(14;18) – FL

(nalezení homologie Bcl-2 a CED9 = „Aha! moment“)

Mitochondrie jako integrátory apoptotických signálů



Proteinová rodina Bcl-2

Struktura proteinů Bcl-2



- Pro všechny proteiny rodiny Bcl-2 je typická konzervovaná sekvence označovaná jako **Bcl-2 homologní motiv**. Každý člen rodiny obsahuje alespoň jednu tuto sekvenci ze čtyř: **BH1** až **BH4**.
- Většina anti-apoptických členů obsahuje **BH1** a **BH2**, proteiny nejvíce podobné Bcl-2 obsahují všechny **čtyři**.
- Pro-apoptické proteiny tvoří dvě podrodiny: jedna (např. Bax, Bak, Bok) je blízce příbuzná Bcl-2 a obsahuje **BH1**, **BH2** a **BH3**, druhá je vzdáleně příbuzná (např. Bik, Blk), obsahuje jen **BH3** a představuje spíše funkční analog proteinu EGL-1 (označují se někdy jako BH3 faktory).
BH3 je nezbytná pro funkci pro-apoptických proteinů.

Struktura pro-apoptotických proteinů Bcl-2



Pro-apoptosis

Bax Subfamily

Bax

Bak

Bok

BH3 Subfamily

Puma

Bik

Noxa

Blk

Bmf

Hrk

BNIP3

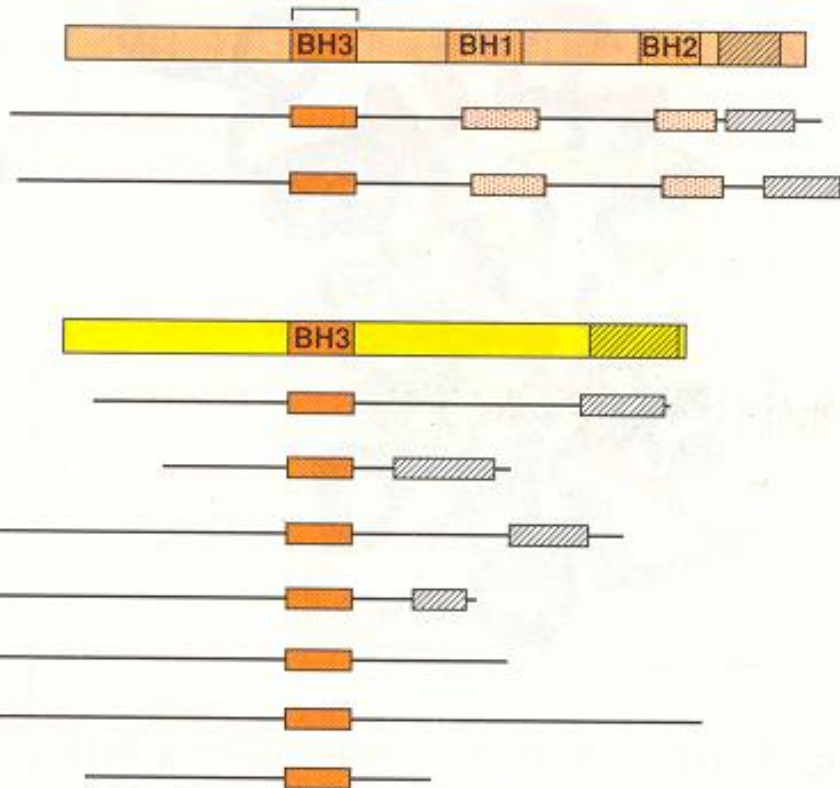
Bim_L

Bad

Bid

EGL-1

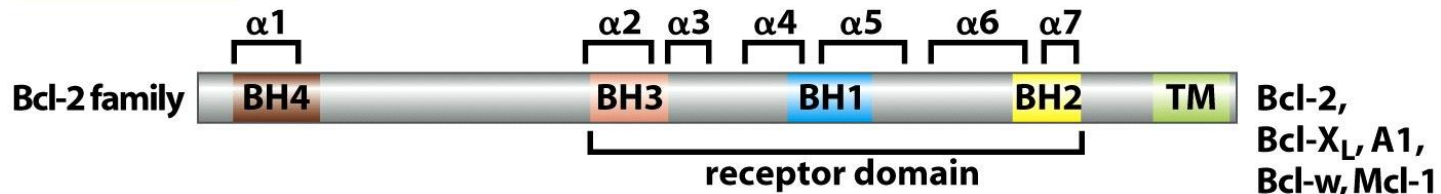
Ligand domain



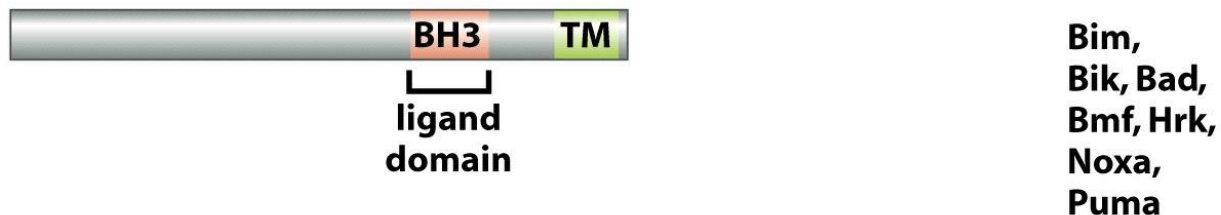
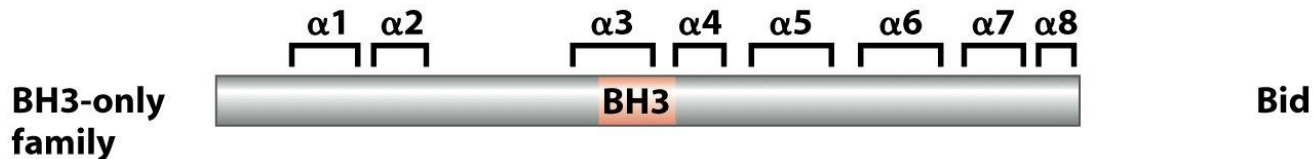
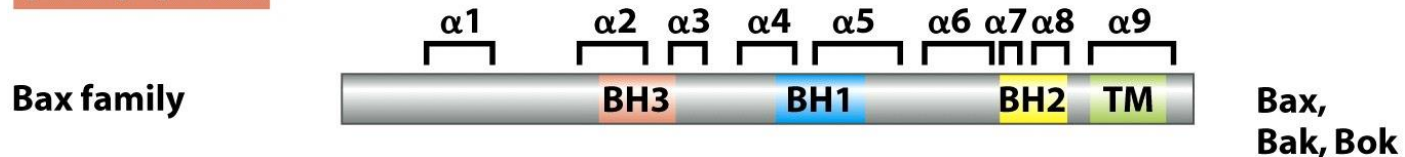
Proteinová rodina Bcl-2



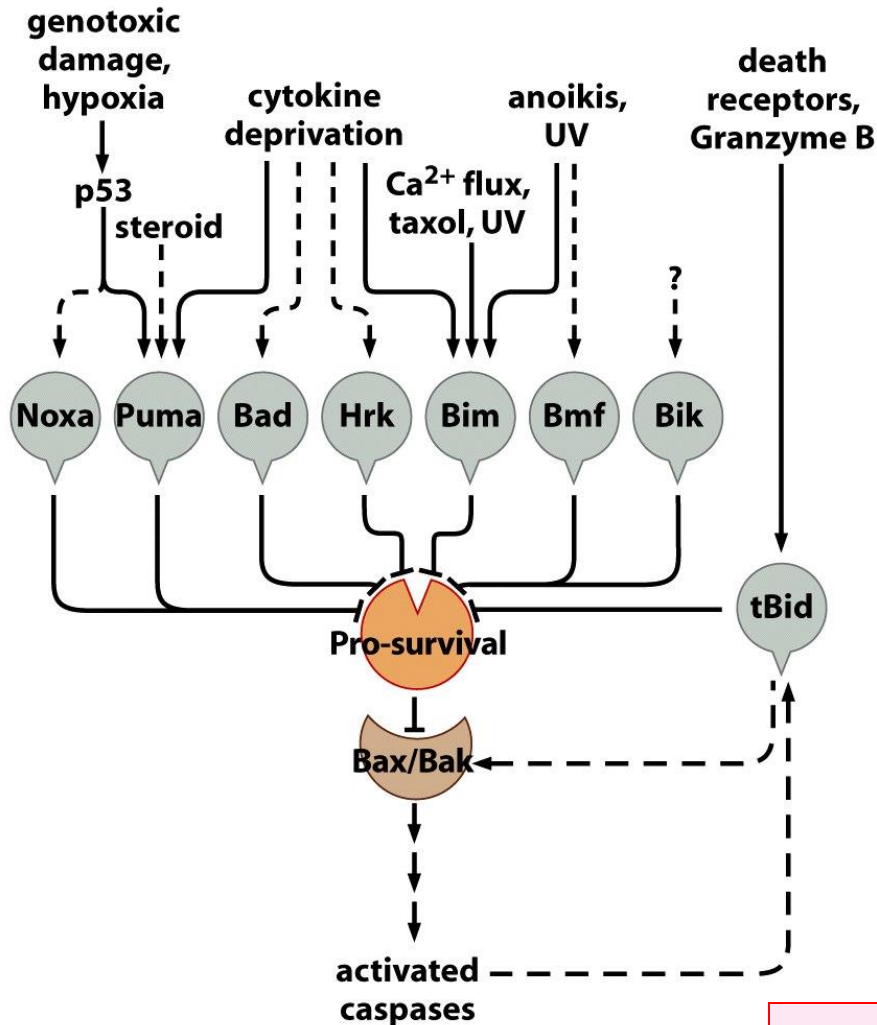
pro-survival



pro-apoptosis

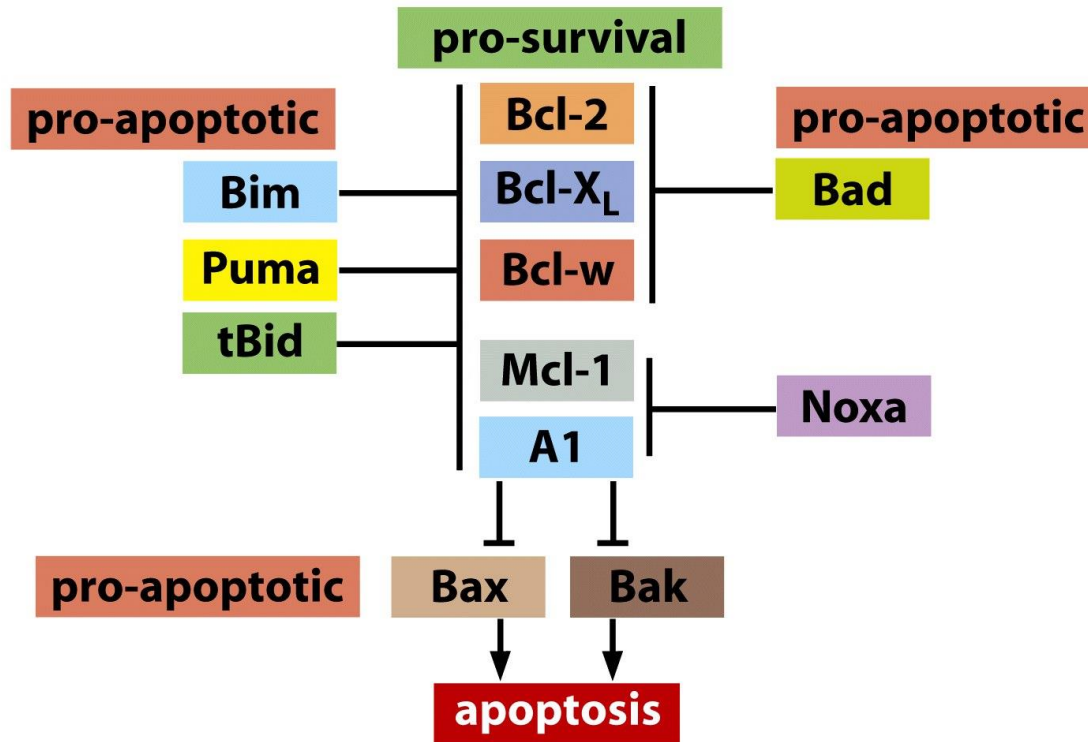


Význam multiplicity pro-apoptotických proteinů



Různé fyziologické stresy/signály fungují prostřednictvím různých proapoptotických proteinů, které mají za úkol antagonizovat anti-apoptotický protein Bcl-2

„Součinnost“ pro- a anti-apoptotických proteinů



Každý člen rodiny Bcl-2 má svůj vlastní soubor antagonistických proteinů. V centru stojí anti-apoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w a Mcl-1.

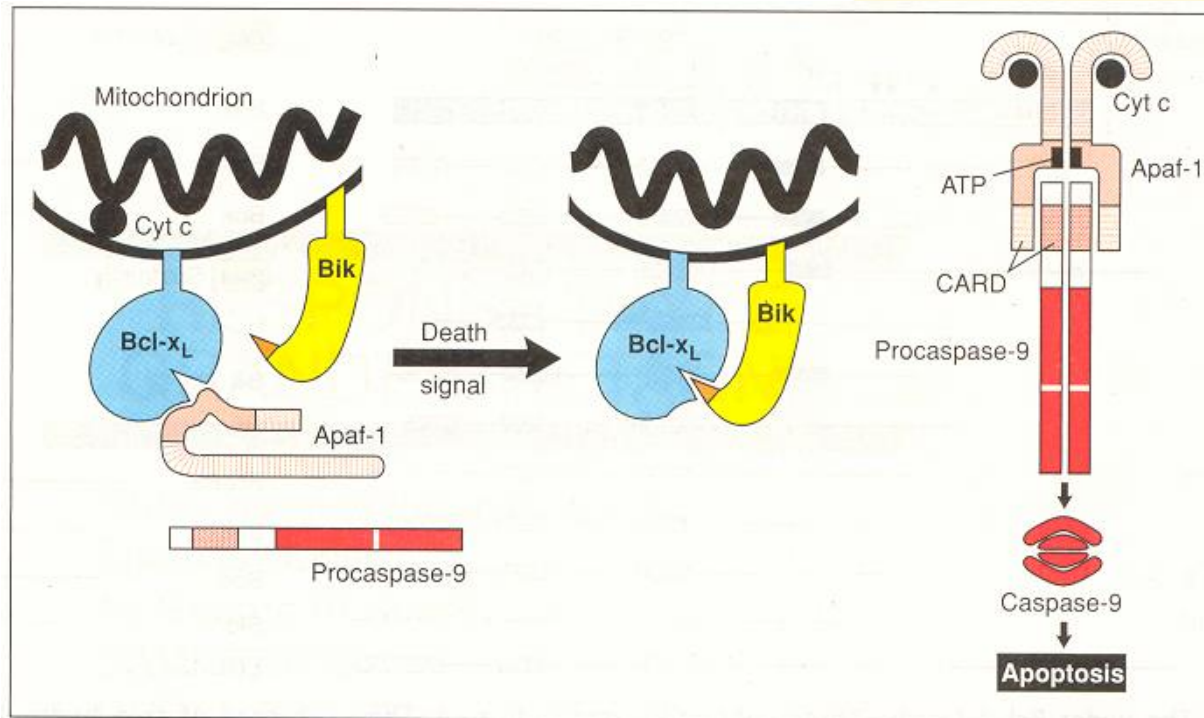
Proteiny Bax a Bak – pokud nejsou „neutralizovány“ vazbou „opozičních“ proteinů, indukují apoptózu otevřením mitochondriálních vnějších kanálů.

Struktura proteinů Bcl-2



- Proteiny z rodiny Bcl-2 mohou tvořit **heterodimery** a titrovat, ovlivňovat navzájem svůj účinek: jejich vzájemné koncentrace tak mohou fungovat jako apoptotický **reostat**.
- Sekvence **BH1**, **BH2** a **BH3** ovlivňují schopnost dimerizovat.
- Heterodimerizace není nezbytná pro anti-apoptotické proteiny.
- U pro-apoptotických proteinů je heterodimerizace nezbytná pro BH3-only faktory,
- ale postradatelná pro proteiny typu Bax.

Model regulace Apaf-1 proteiny Bcl-2



- Anti-apoptotický protein (Bcl-X_L) zabraňuje Apaf-1 aktivovat prokaspázu-9.
- Pro-apoptotický protein (Bik) může být stimulován k interakci s tímto proteinem a tak zrušit tuto inhibici apoptózy.

Proteiny Bcl-2 a nádory



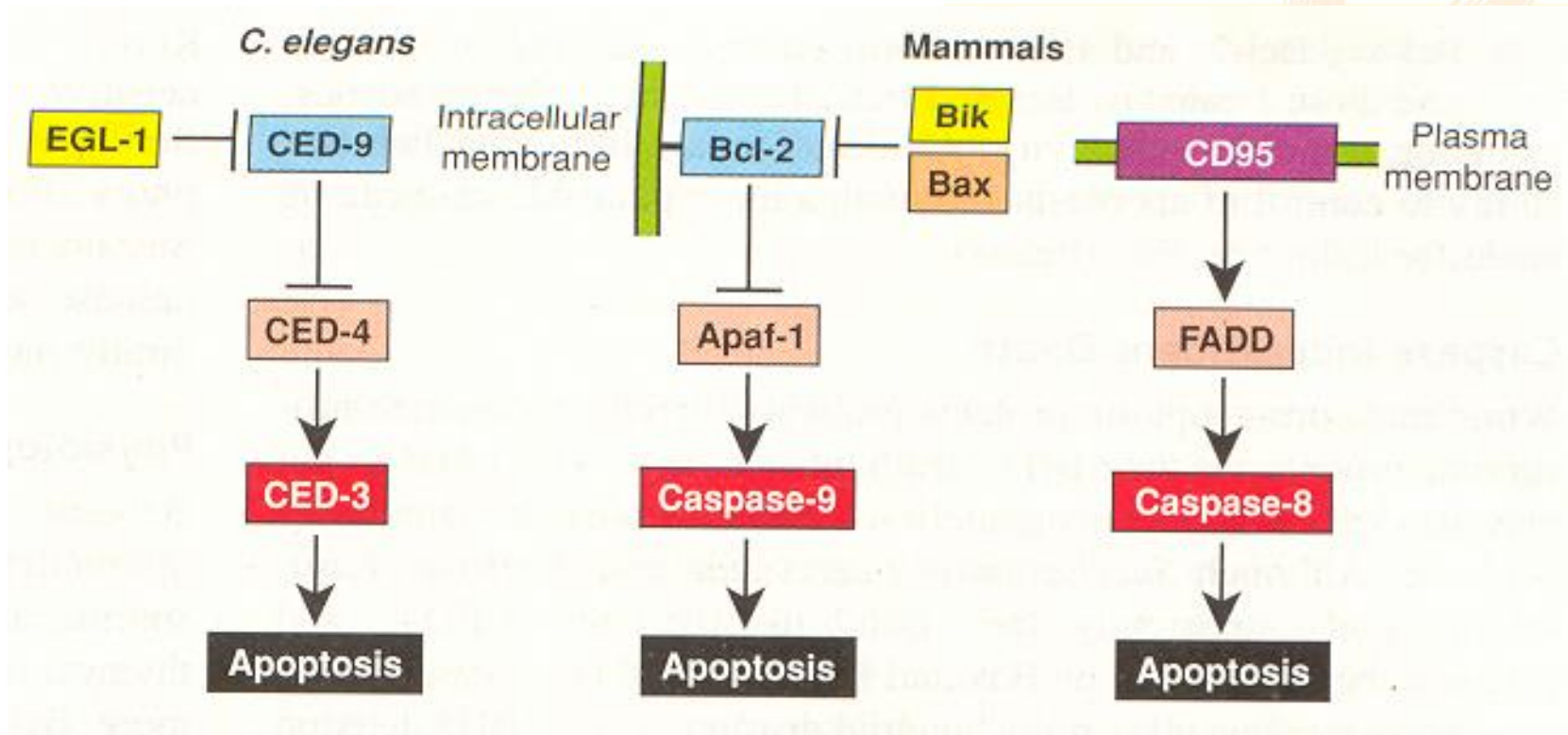
Potenciálně jsou **anti**-apoptotické proteiny **onkogenní**:

- ***bcl-2*** v translokacích spojených s folikulárními lymfomy a difúzními velkobuněčnými lymfomy a CLL
- Nepřímá účast v kancerogenezi: **Myb**, **Ras**,.. indukují expresi *bcl-2*. Exprese *bcl-2* zvýšena např. u myeloidních leukémií, nádorů žaludku.

Pro-apoptotické proteiny jsou potenciálními **nádorovými supresory**:

- ***bax*** je mutován u některých nádorů trávicího traktu (Lynchův syndrom!) a některých leukémií
- exprese *bax* (a dalších) redukována u nádorů s mutací **TP53**

Apoptotické dráhy u hlíst a savčí buňky

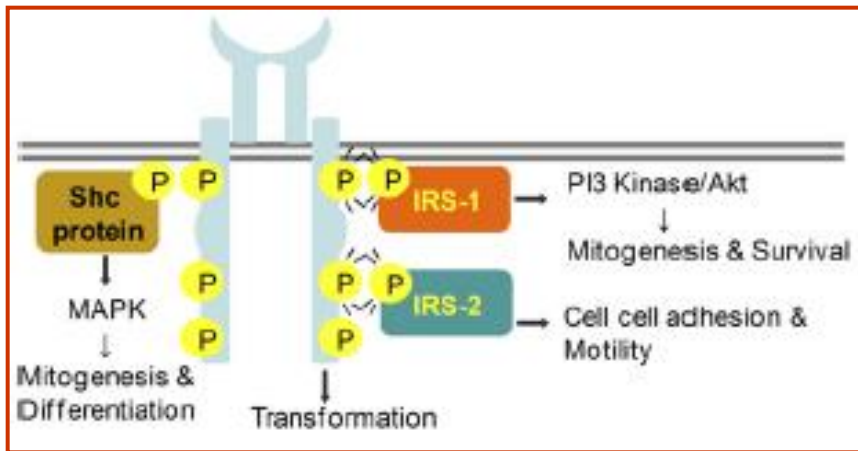


Klíčové rozdíly apoptotické mašinerie nematod a savců: **cytochrom C**, proteiny **IAP** ⇒ savčí apoptóza je **komplexnější**

Signály přežití (X signály smrti)



- Některé cytokiny mají povahu signálů přežití (nikoli mitotických signálů!).
- **IGF-I** („insuline-like growth factor“)
- tyrosin protein kinázový receptor
- funguje jako heterotetramer (2 podjednotky α a β)
- signál je přenášen přes PI3K a vede k:



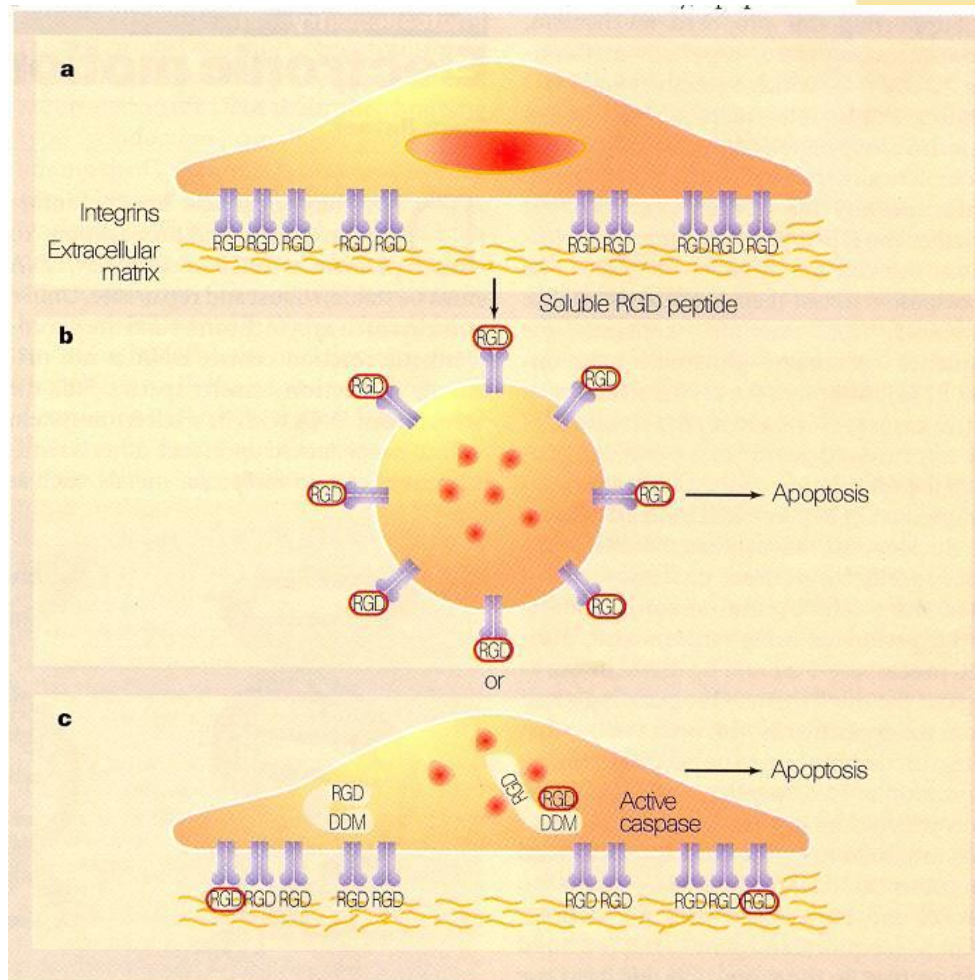
- buněčné proliferaci, inhibici apoptózy (případně indukci diferenciace);
- může indukovat maligní transformaci, reguluje mezibuněčné interakce a pohyb buněk.

Anoikis



- Většina buněk potřebuje být přichycena k extracelulární matrix (ECM), aby mohla přežít („anchorage dependent cell survival“). Tuto vazbu zprostředkovávají integriny.
- Buňka, která ztratí kontakt s ECM, zahájí apoptózu - tzv. anoikis (z řečtiny - bezdomovectví).
- Integriny rozpoznávají na cílových proteinech ECM sekvenci arginin-glycin-aspartát (RGD).
- Vazba integrinů k ECM není o prostém přichycení, ale hlavně o získávání nutných signálů přežití.

Úloha proteinů RGD v apoptóze



Buňky přisedají k ECM vazbou integrinů.

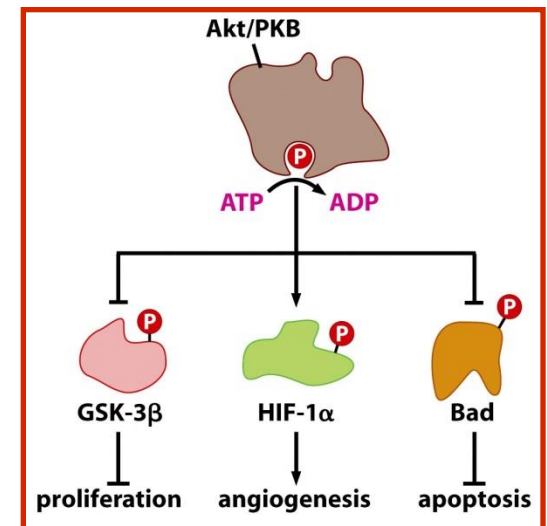
Přidání solubilních RGD proteinů způsobuje apoptózu aktivací kaspázy-3.

Vazbou integrinů k ECM získává buňka signály k přežití.

Anoikis



- Na zprostředkování „anchorage-dependent cell survival“ se podílí **FAK**.
- FAK je jedním z cílů kaspáz během apoptózy.
- Signalizace FAK je pravděpodobně zprostředkována **PI3K**, a to buď přímou interakcí FAK s podjednotkou p85 nebo aktivací **Ras** a následnou aktivací PI3K.
- Signalizace PI3K potom vede přes **c-Akt** k fosforylaci pro-apoptotického proteinu **Bad**.



Kaspázy - efekторы apoptózy



- Rodina cysteinových proteáz, které mají specifitu k aspartátové kyselině na substrátu („cysteine **asp**artyl-specific prote**ases**“).
 - Analogy proteinu **CED-3**. První savčí popsaná kaspáza: **ICE*** („interleukin-1 β -converting enzyme“) - **kaspáza-1**
 - Jsou hlavními vykonavateli finální exekuční fáze apoptózy.
 - Jsou konstitutivně přítomny v cytosolu buněk, a to ve formě jednořetězcového proenzymu jako **prokaspázy**.
Např. prokaspáza-8 má asi 1-2% aktivity plně funkční kaspázy-8.
 - Sdílejí podobnost sekvenční, strukturní a substrátovou.
- * ICE nemá prokazatelnou úlohu v apoptóze, ale byla to první identifikovaná proteáza celé rodiny proteinů, které mají úlohu v apoptóze a zánětu.

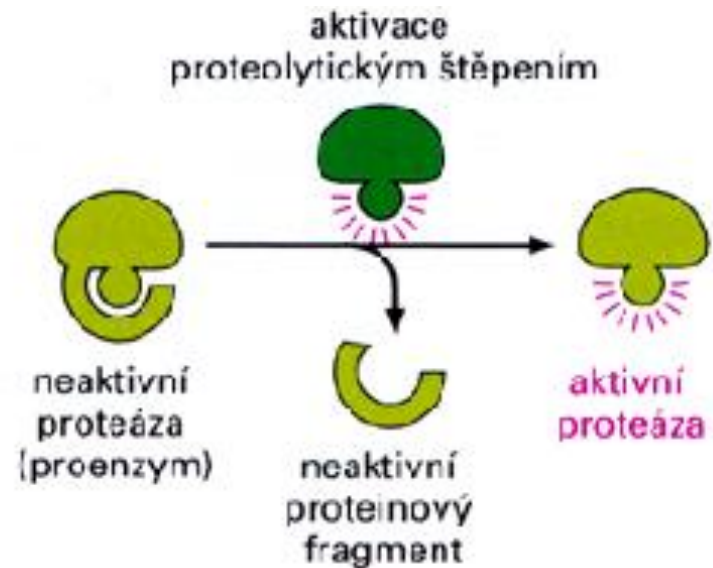
Aktivace kaspáz



Proenzym má velikost 30 až 50 kD a tři domény: N-terminální, velkou podjednotku (20 kD) a malou podjednotku (10 kD).

Prokaspázy jsou aktivovány dvojím **proteolytickým štěpením**:

- Molekula prokaspázy je rozštěpena na dvě podjednotky - menší a větší.
- Je odštěpena N-terminální doména.
- Podjednotky vytvoří **tetramer** (2+2 podjednotky) se dvěma aktivními místy.

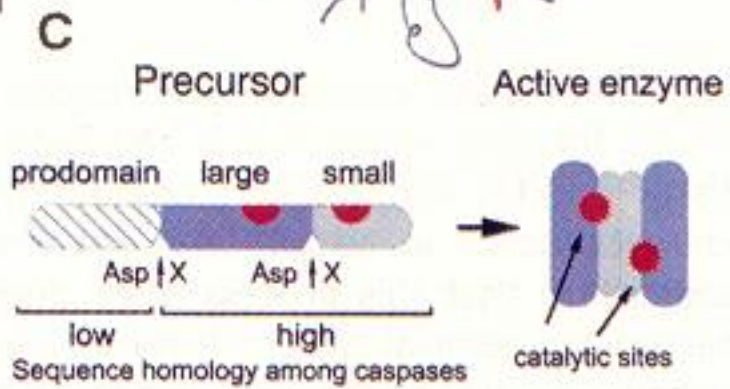
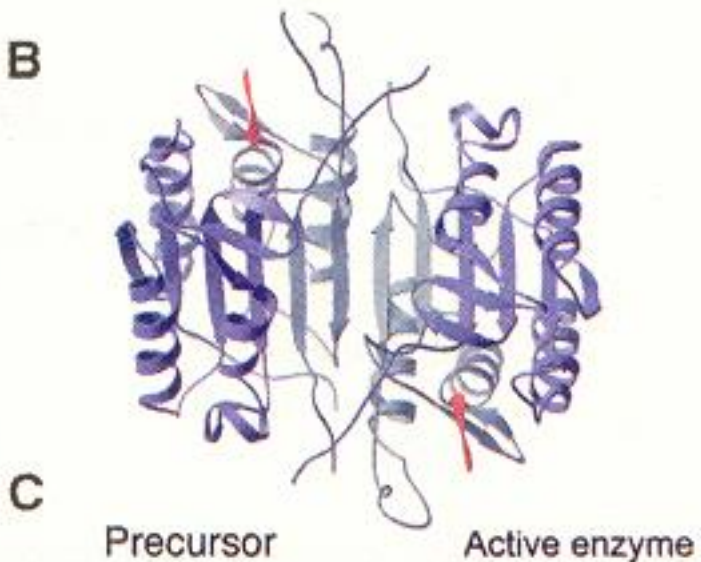
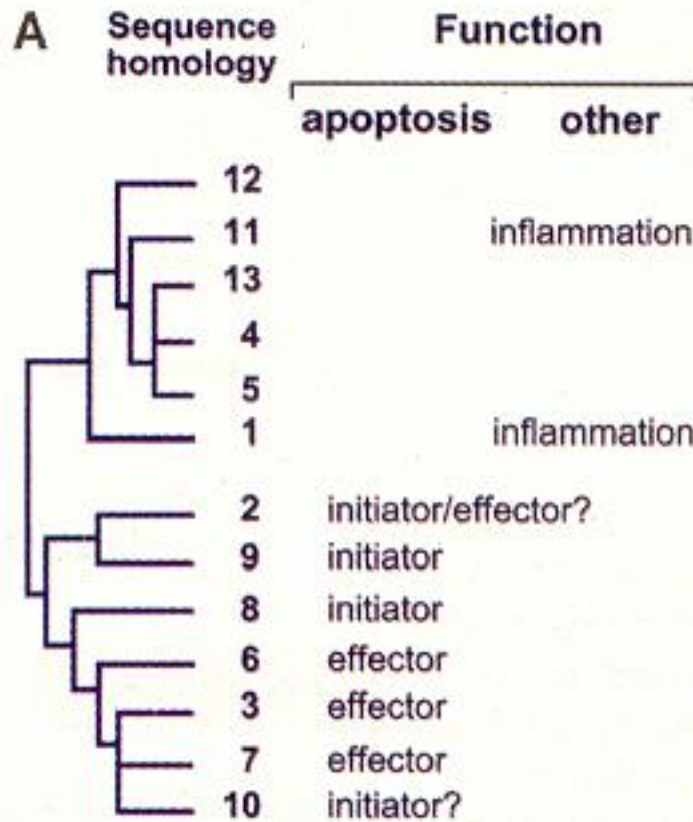


Aktivace kaspáz



- Kaspázy patří k proteázám s nejvyšší specifitou a vysokou aktivitou. Ve specifitě jsou mezi kaspázami rozdíly - mají odlišné funkce.
 - Všechny prokaspázy jsou aktivovány štěpením v místě, které je **konsensus sekvencí*** pro kaspázy.
- ⇒ Kaspázy jsou aktivované autokatalyticky nebo enzymy s podobnou specifitou.
- Během apoptózy fungují jako **iniciátory** (2, 8, 9, 10), kdy iniciují řetězec - kaskádu událostí jako odpověď na proapoptotické signály, a jako **efektory** (3, 6 a 7), kdy se podílejí na odstranění buňky (degradaci proteinů).
- * Štěpí za kyselinou aspartovou a rozpoznávají alespoň další 4 aminokyseliny směrem k N-konci molekuly.

Struktura a funkce kaspáz



Regulace kaspáz



Kaspázy jsou v neaktivní formě konstitutivně přítomné v buňce:

⇒ jejich aktivitu lze rychle indukovat

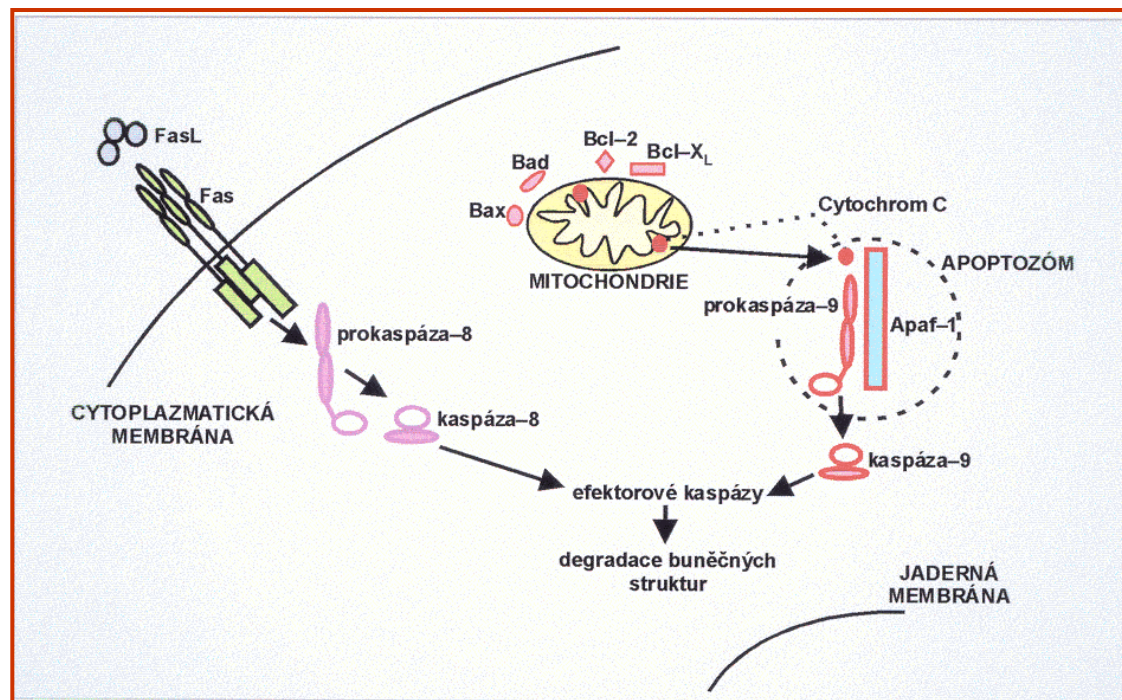
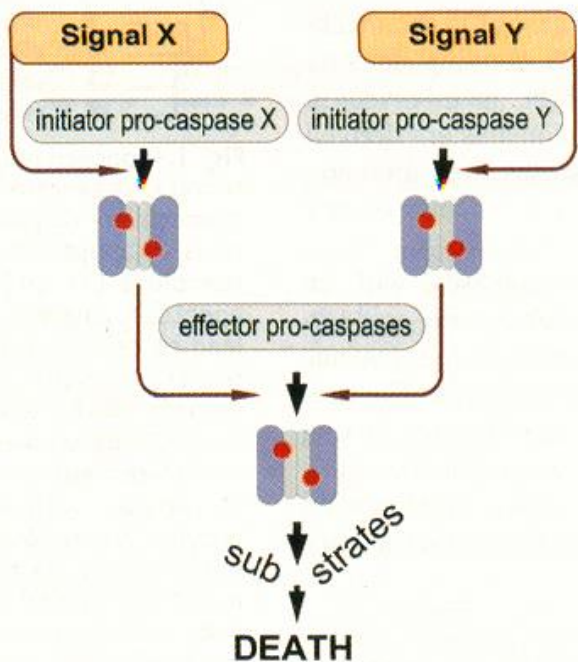
⇒ jejich regulace musí být velmi efektivní

1. Aktivace iniciačních kaspáz - především kaspázy-**8** a kaspázy-**9** (**2, 10**)
 2. Aktivace efektorových kaspáz (**3, 6, 7**)
- Různé iniciační kaspázy zprostředkovávají různé signály (receptory smrti - kaspáza-8, cytotoxické látky - kaspáza-9), ale spouštějí stejné následné efektorové kaspázy. Tak je vysvětleno, jak různé apoptotické signály vedou ke stejným biochemickým a morfologickým změnám.
 - Proapoptotické signály kulminují aktivací iniciačních kaspáz, které potom následně aktivují efektorové kaspázy - kaskádový model.

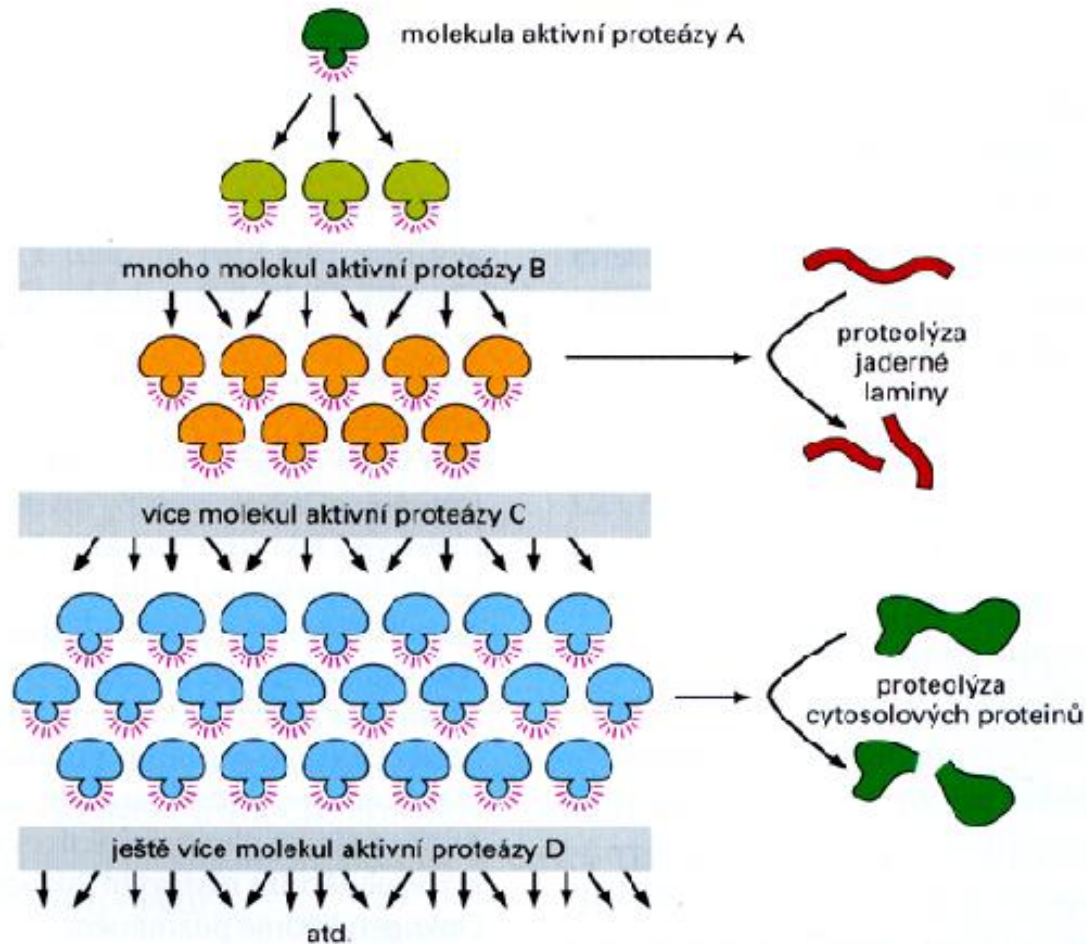
Různé apoptotické signály mají stejný výsledek



Caspase cascade



Kaspázy fungují v aktivační kaskádě



Aktivace iniciačních kaspáz



Kaspázy jsou regulovány pomocí jak aktivátorů, tak inhibitorů.

Apoptotické signály iniciují tři dráhy:

1. Aktivaci kofaktorů

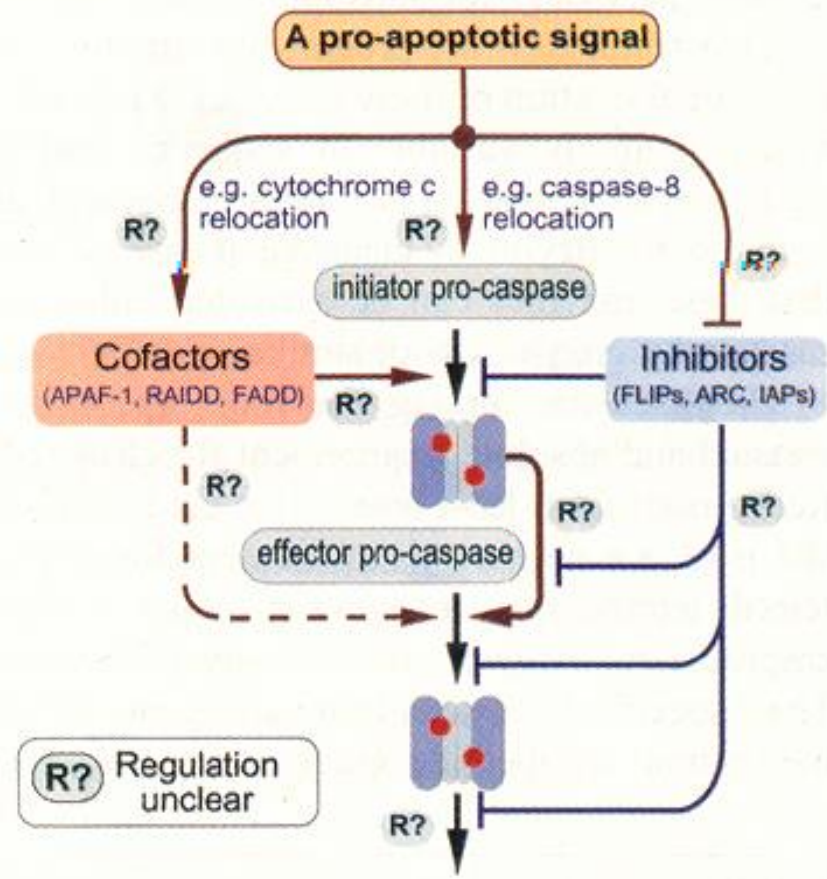
- uvolnění **cytochromu C**, tvorba komplexu s **APAF-1**,...
- aktivace **FADD**, ..

2. Modifikace prokaspázy

- např. přemístění prokaspázy-8 k receptorovému komplexu,...

3. Inaktivace inhibitorů

- **FLIP**, **ARC**, **IAP**,...



Inhibitory kaspáz IAPs

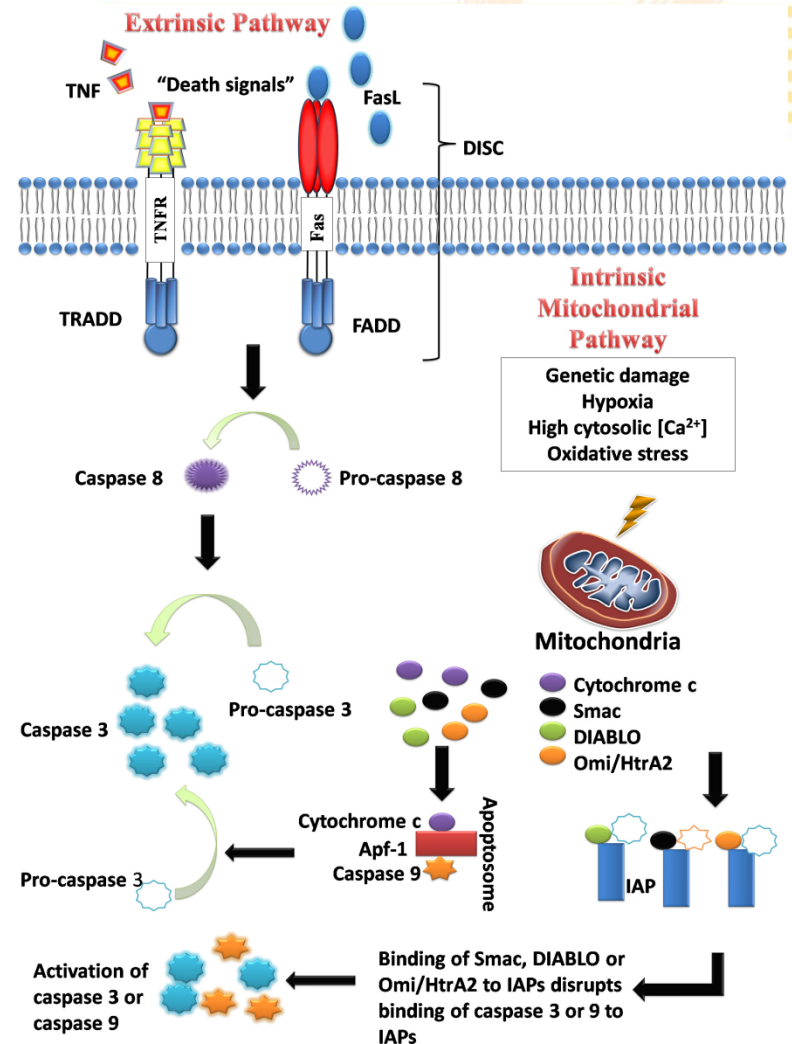


- (c-FLIP)
- Inhibitors of **A**poptosis **P**roteins
 - skupina strukturně i funkčně příbuzných proteinů – obsahují doménu **BIR** (**B**aculovirus **IAP** **R**epeat)
 - alespoň 8 různých IAPs u člověka: - např. **NAIP** (BIRC1) **Survivin** (BIRC5), **XIAP** (BIRC4), **clAP1** (BIRC2), **clAP2** (BIRC3), **Apollon** (BIRC6), **Livin** (BIRC7)...
 - váží se na kaspázy prostřednictvím domény BIR a blokuje jejich aktivitu nebo indukují jejich degradaci
 - U některých nádorů je např. zvýšená exprese Survivinu.

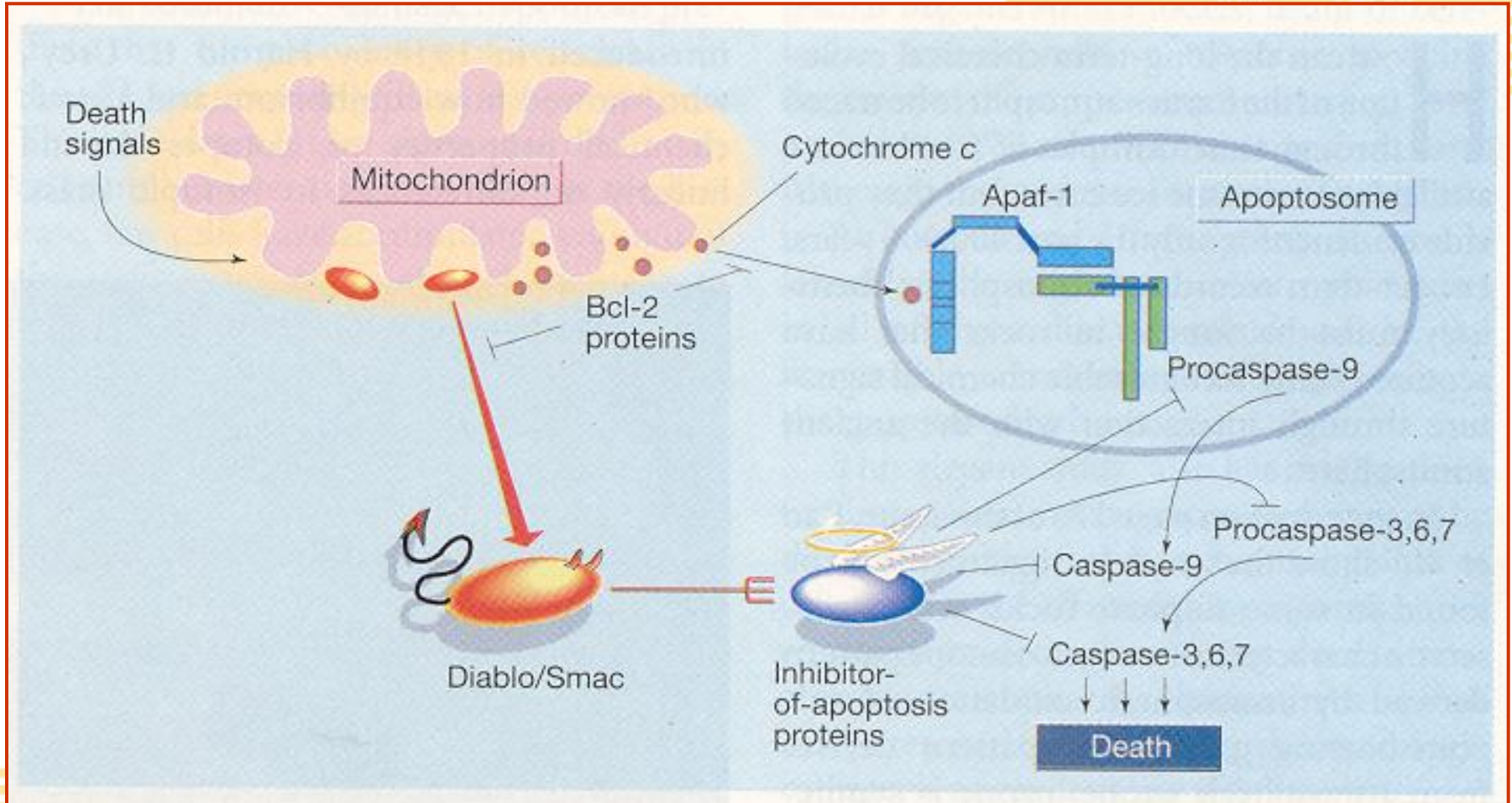
Inhibitory inhibitorů: pro-apoptické proteiny



- Naopak proteiny **DIABLO/Smac** (*direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI/ second mitochondria-derived activator of caspase*), **Omi/HtrA2** (*high temperature requirement protein A*) se mohou vázat na proteiny IAP a inhibovat jejich působení. Ovlivňují tak citlivost buněk k apoptotickým signálům.



Regulace apoptózy: IAP a DIABLO/Smac



Úkoly kaspáz



A. Inaktivace inhibitorů apoptózy, např.:

- Inaktivace **I^{CAD}**, který je inhibitorem **CAD** - nukleázy, která je odpovědná za fragmentaci DNA.
- Inaktivace **Bcl-2** - pravděpodobně je tak nejen inhibován inhibitor apoptózy, ale produkován i fragment, který potencuje apoptózu (amplifikace!).

B. Desintegrace buněčných struktur, např.:

- Destrukce jaderné laminy - struktura pod jadernou membránou, která se podílí na kondenzaci chromatinu.

Úkoly kaspáz

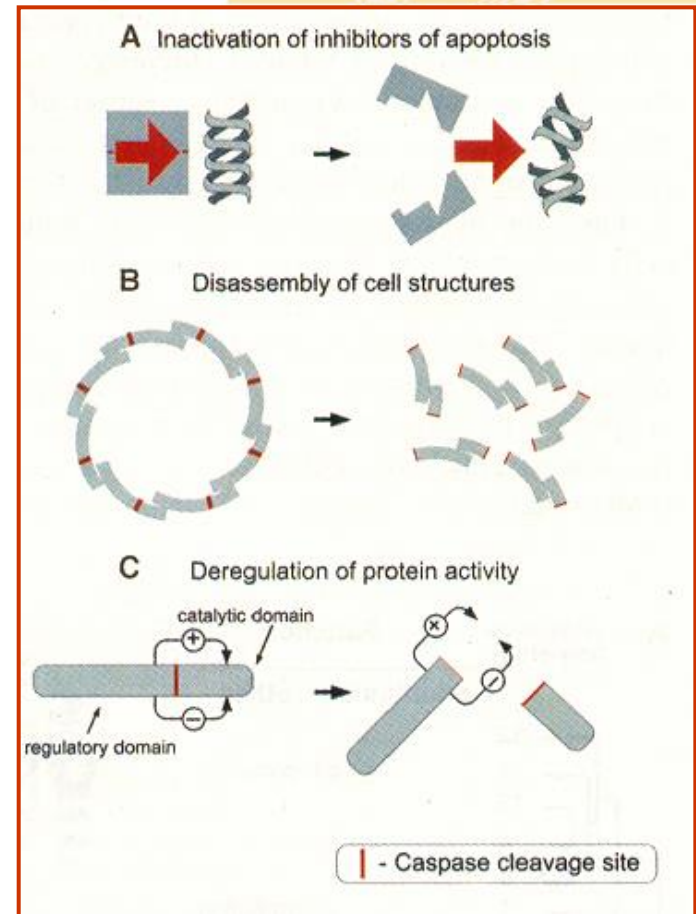


C. Inaktivace některých proteinů

(separováním regulační a katalytické podjednotky), účastnících se:

- regulace cytoskeletu (FAK, kináza PAK2,..)
- replikace DNA
- oprav DNA
- sestřihu mRNA, ..

D. Účast kaspáz a dalších „apoptotických“ molekul - např. FADD - v **regulaci buněčného cyklu!**

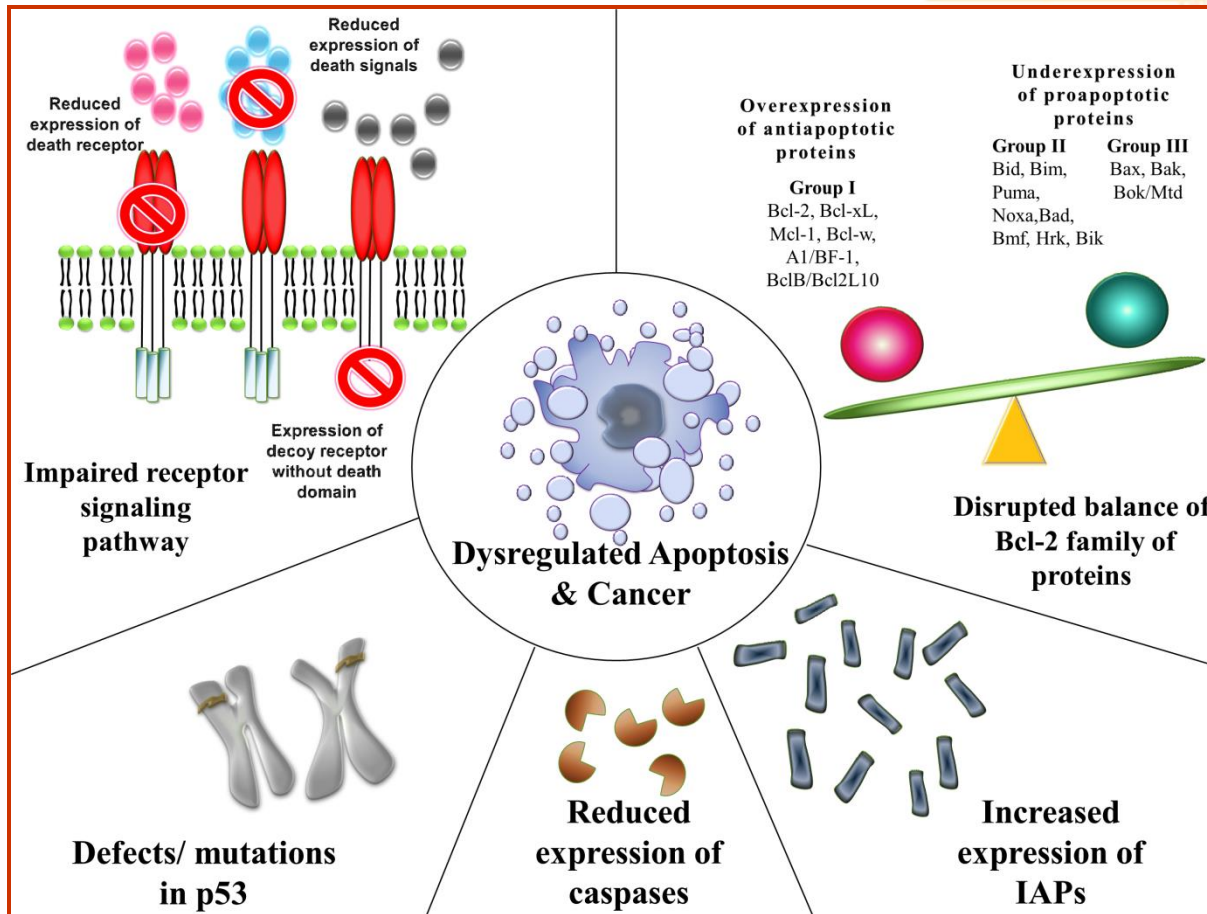


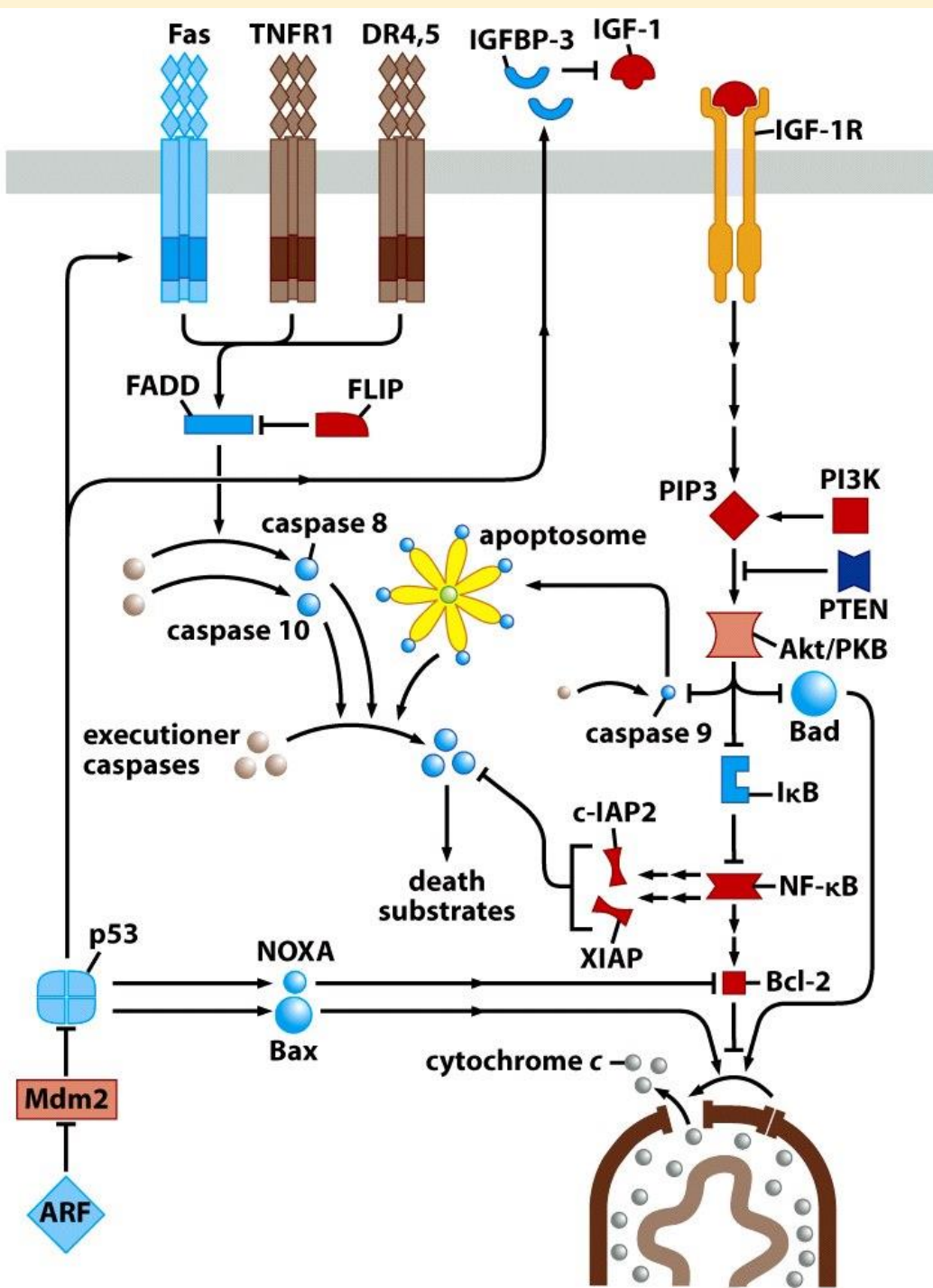
Poškození apoptózy u nádorů



1. poškození **receptorové dráhy**: (i) snížená exprese receptorů smrti (např. Fas); (ii) snížená exprese signálů smrti (např. FasL); (iii) zvýšená exprese decoy receptorů
2. porušení rovnováhy proteinů **rodiny Bcl-2**: (i) zvýšená exprese antiapoptotických proteinů (např. up-regulace *bcl-2* chromozomální translokací t(14;18) ve folikulárních lymfomech); (ii) snížená exprese proapoptotických proteinů
3. poškození funkce **p53** (regulace apo mechanismem transaktivace *bax* a dalších genů a přímou regulací mitochondrií)
4. snížení exprese **kaspáz**
5. zvýšení exprese **inhibitorů apoptózy** (např. survivinu a dalších IAPs)
6. zvýšení exprese **faktorů přežití** (např. IGF-1, IGF-2)

Poškození apoptózy u nádorů

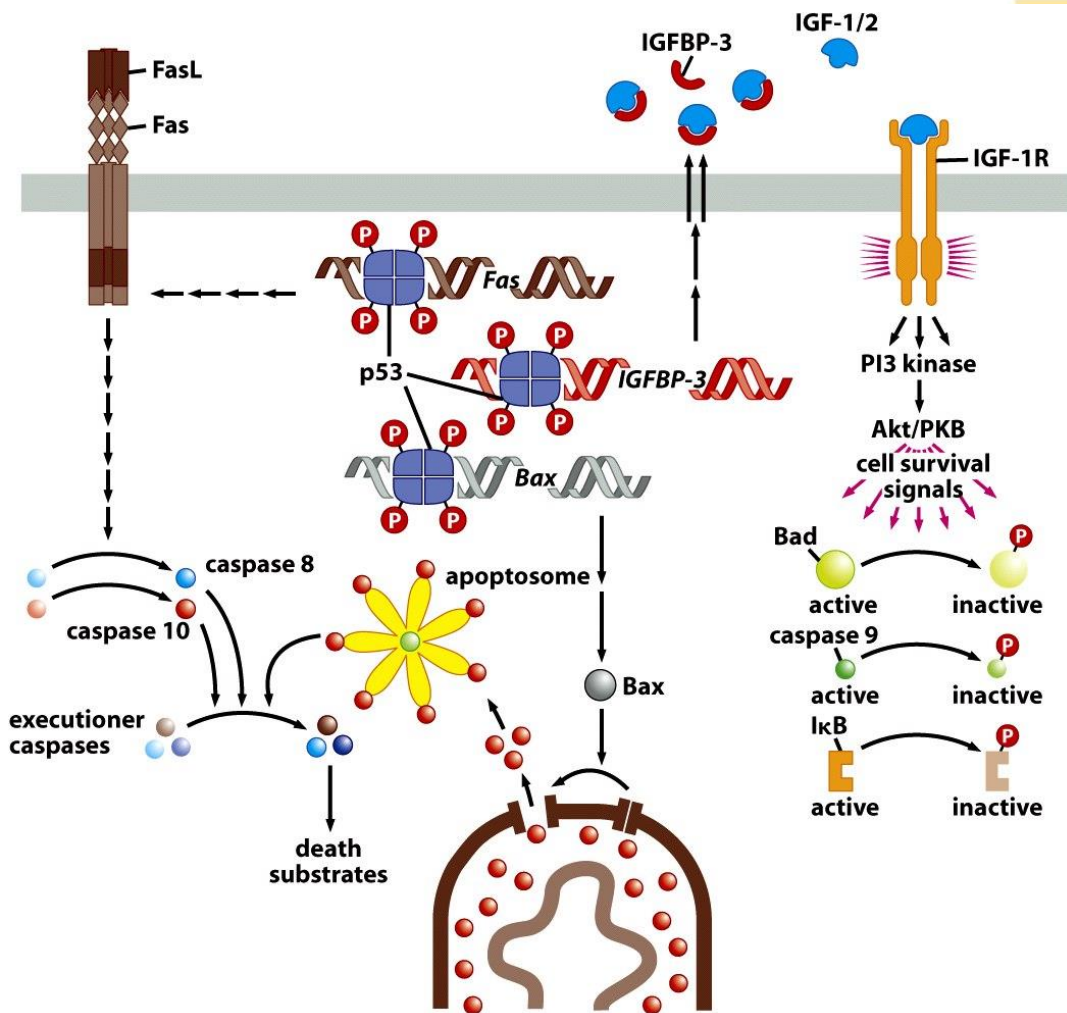




Anti-apoptické strategie nádorů

Nádory používají nejrůznější strategie, jak zmenšit šanci na vstup do apoptózy. Buď snižují hladinu/aktivitu **proapoptických** (modře) proteinů, nebo zvyšují hladinu/aktivitu **antiapoptických** (červenohnědě) proteinů.

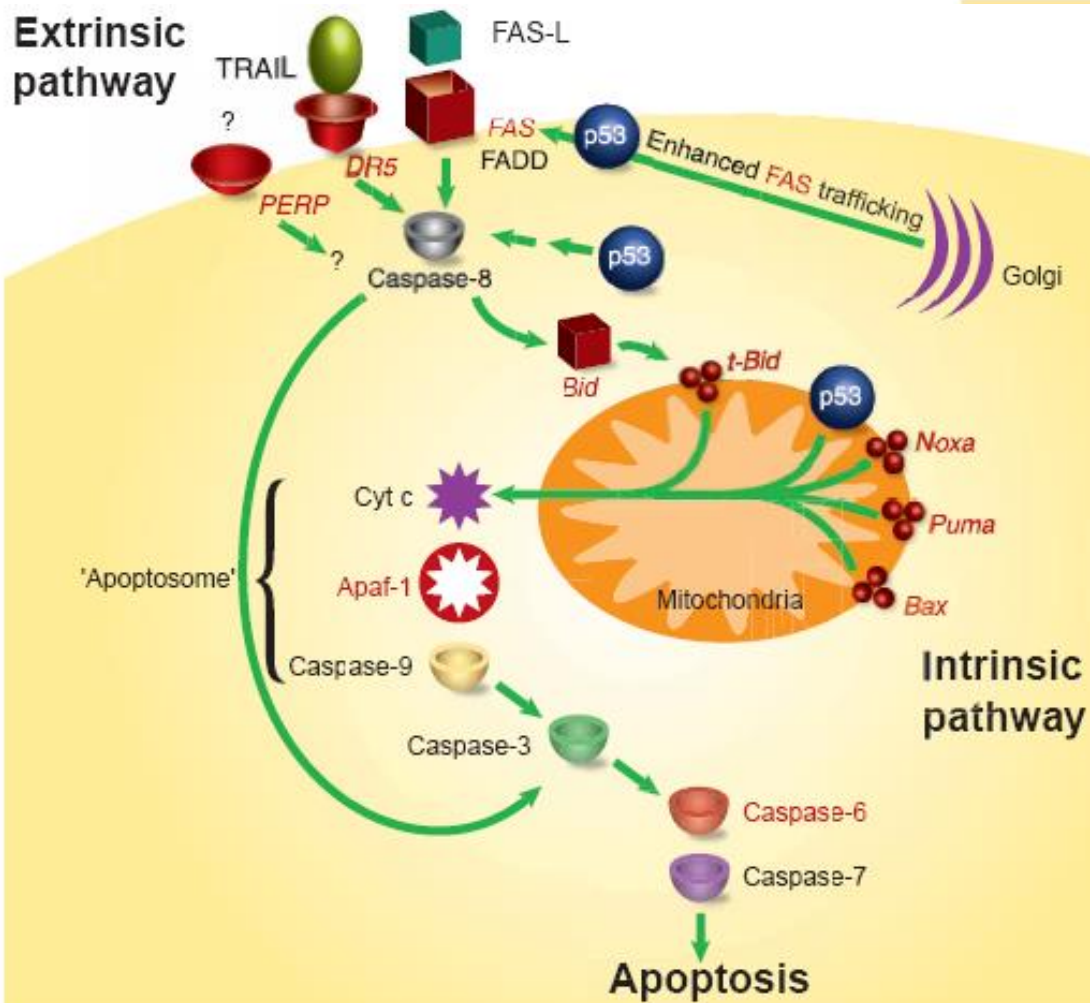
Aktivace apoptózy nádorovým supresorem p53



p53 aktivuje apoptózu několika signálními drahami:

1. ↑ Transaktivuje *fas* (na povrchu buňky se tak vystavuje receptor Fas a buňka se stává citlivou k působení FasL, který může být přítomen v extrabuněčném prostoru).
2. ↑ Indukuje expresi *IGFBP-3* (IGF-binding protein-3) a jeho uvolňování do extracelulárního prostoru, kde váže IGF-1R. Bez vazby IGFBP-3 se na receptor IGF-1 váže IGF-1 a to vede k uvolnění anti-apoptotických signálů v buňce, které inaktivují Bad, kaspázu-9 a IκB.
3. ↑ Indukuje expresi *bax*, což vede k uvolnění cytochromu C z mitochondrií.
4. ↓ Inaktivuje některé anti-apoptotické faktory, např. *Smac/DIABLO*.

Aktivace apoptózy nádorovým supresorem p53



cílové geny p53
jsou označeny
červeně

Inhibitory apoptózy



- c-FLIP
- IAPs
- **NF- κ B**
 - stimuluje přežívání, buněčný růst, metastatický potenciál,...

Autofagie



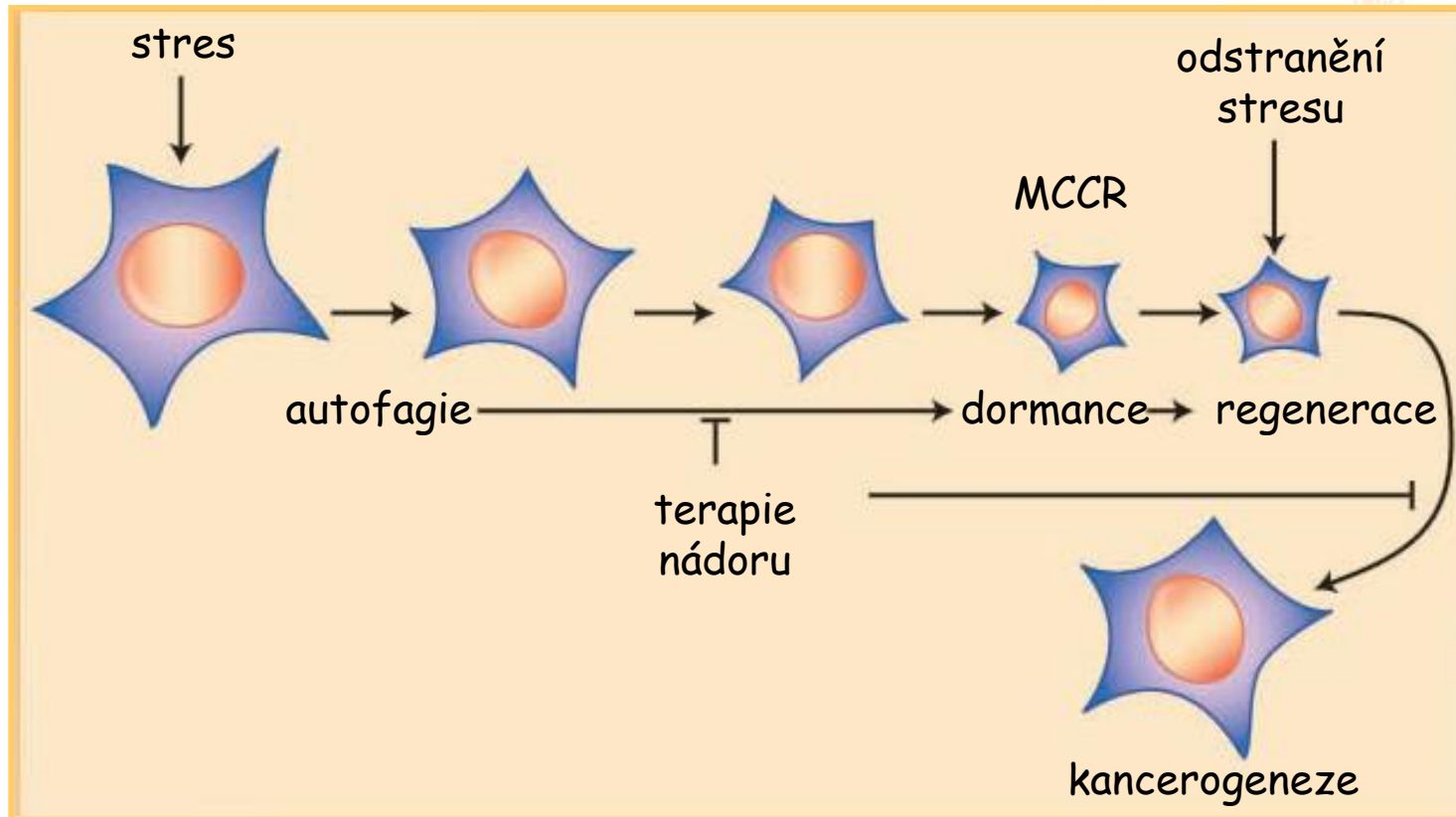
- Fyziologický program autofagie vede k degradaci buněčných organel (např. ribozomů, mitochondrií), což umožňuje využít výsledné katabolity k biosyntéze a metabolismu energie. To stimuluje přežití v podmínkách stresu a hladovění, nedostatku.
- Intracelulární váčky – autofagozomy – pohlcují organely a fúzí s lysozomy, následně probíhá degradace.
- Normálně běží jen na bazální úrovni, ale může být výrazně stimulována stresem a nedostatkem živin.
- Zřejmé propojení regulace autofagie, apoptózy a buněčné homeostáze. Signální síť zahrnuje **PI3-K**, **AKT**, **mTOR**.
- Specifickým regulátorem autofagie je **Beclin-1**, který patří mezi BH3-only proteiny.

Autofagie



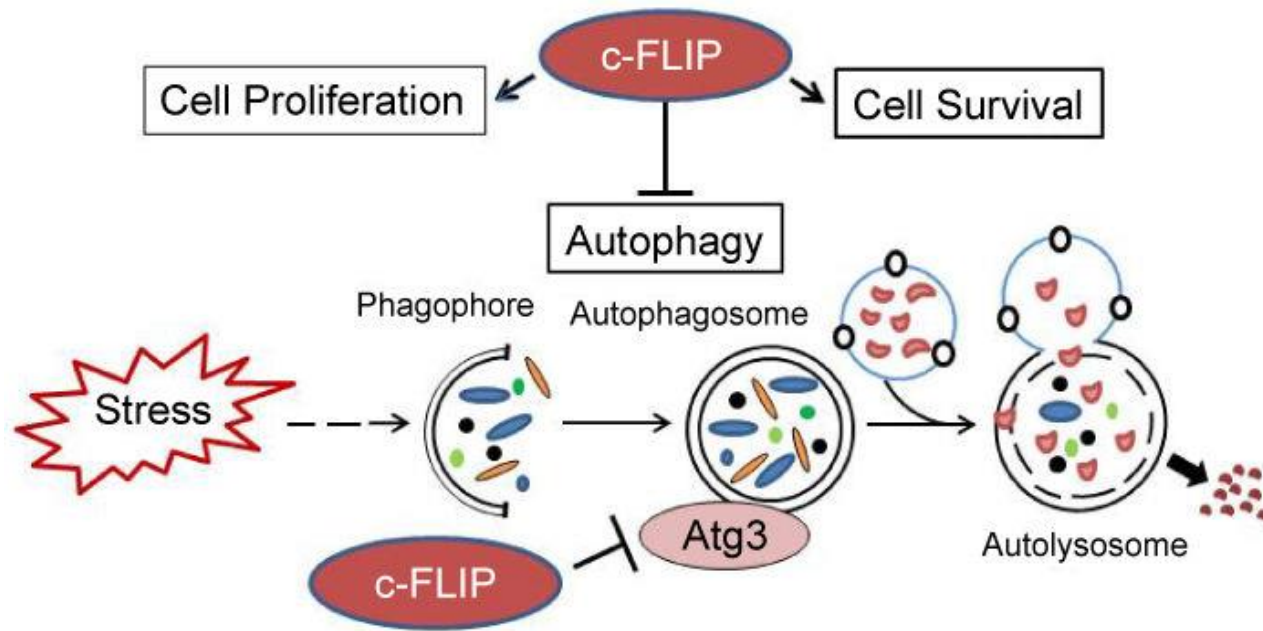
- Indukce autofagie může sloužit jako bariéra proti vývoji nádorů a může fungovat nezávisle na apoptóze, ale také v kooperaci s apoptózou. Možná tak představuje další nezávislou bariéru proti nádorům.
 - Hladovění, radioterapie, některé cytotoxické léky mohou stimulovat autofagii, která má zřetelné cytoprotektivní účinky u nádorových buněk. Může spíše umožňovat jejich poškození než přímo zničení.
 - Těžce stresované buňky se mohou díky autofagii zmenšit a vstoupit do stavu přechodné dormance, což umožní přežití a pozdější (po odeznění účinku terapie) další růst a vývoj.
- ⇒ „**dvousečná zbraň**“ (*double-edged sword*) autofagie při modulaci nádorů

Autofagie moduluje přežití a regeneraci nádorových buněk



MCCR –minimal cells capable of recovery

Inhibitor apoptózy c-FLIP inhibuje autofagii



- c-FLIP inhibuje autofagii přímou interakcí se složkami autofagové mašinerie

Terapie nádorů zacílená na apoptózu



1. rodina proteinů **Bcl-2**: inhibice proteinu Bcl-2 (antisense oligonukleotidy, nízkomolekulární inhibitory)
 2. protein **p53** (genová terapie, malé molekuly obnovující funkční konformaci proteinu, p53 vakcíny, ...)
 3. inhibitory **IAPs** (siRNA; antisense oligonukleotidy, ...)
 4. samotné **kaspázy**: nízkomolekulární aktivátory, např. apoptotin, genová terapie,...)
- vs. **receptory** smrti (indukce zánětu!) a **c-FLIP** (příliš velká podobnost s kaspázou-8 – inhibitory by inhibovaly také kaspázu-8)